

**Gas-chromatographische Bestimmung
von Blutspiegelkurven malariawirksamer
Aminochinoline**

von

Hanns Paulus

aus

Alling b. Regensburg

1972 # 420





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1972

Dekan: Universitätsprofessor Dr. K. J a c o b s

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. D a n n

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. G. H e s s e

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1969 bis
März 1972 im Institut für Angewandte Chemie der Universität
Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. D a n n,
der die Anregung zu dieser Arbeit gab, danke ich herzlich für seine
fördernde Unterstützung und für das mir stets entgegengebrachte
Verständnis.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zusammenfassung	1
1. <u>Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnis der Untersuchungen</u>	3
1.1. <u>Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese</u>	3
1.2. <u>Theorie über die Wirkungsweise der 8-Aminochinoline</u> ...	4
1.3. <u>6-Aminochinoline</u>	4
1.4. <u>Theorie über die Wirkungsweise der 6-Aminochinoline</u> ..	5
1.5. <u>Bekannter Einfluß von Substituenten in 4- und 8-Stellung der 6-Amino-2,4-dimethyl-chinoline auf die biologische Aktivität</u>	6
1.6. <u>Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen</u>	8
1.6.1. <u>Blutspiegelkurven der untersuchten Aminochinoline</u>	10
1.6.2. <u>Interpretation der Blutspiegelkurven</u>	10
1.6.3. <u>Folgerungen</u>	14
1.7. <u>Oxydierbarkeit durch Kaliumhexacyanoferrat (III)</u>	15
2. <u>Wahl der Analysenmethode</u>	19
2.1. <u>Bisher angewandte Methoden</u>	19
2.1.1. <u>Photometrie im sichtbaren Licht</u>	19
2.1.2. <u>UV-Spektroskopie</u>	20
2.1.3. <u>Fluorometrie</u>	20
2.1.4. <u>Isotopenmarkierung</u>	21
2.1.5. <u>Chromatographie</u>	21

2.2.	<u>Wahl der eigenen Arbeitsweise</u>	22
3.	<u>Ausarbeitung der eigenen Bestimmungs-</u> <u>methode</u>	24
3.1.	<u>Entwicklung des Extraktionsverfahrens</u>	24
3.1.1.	Gewinnung der Blutproben	24
3.1.2.	Wahl des Extraktionsmittels	25
3.1.3.	Wahl der Extraktionsbedingungen	27
3.2.	<u>Nachweis mit dem ⁶³Ni Elektroneneinfang-</u> <u>Detektor (ECD)</u>	31
3.2.1.	Acylierung	31
3.2.2.	Bromierung	32
3.3.	Nachweis mit dem stickstoffselektiven Detektor (NsFID)	40
3.3.1.	Entwicklung eines Anreicherungsverfahrens für den NsFID	42
3.3.1.1.	Untersuchte Anreicherungsöglichkeiten	42
3.3.1.2.	Anreicherungsgläser	44
3.4.	<u>Die gas-chromatographische Apparatur</u>	48
3.4.1.	Herstellung der Trennsäulen	49
3.4.2.	Der stickstoffselektive Detektor	53
3.5.	<u>Arbeitsweise mit innerem Standard</u>	57
4.	<u>Tierversuche</u>	61
4.1.	<u>Durchführung der Versuche</u>	61
4.1.1.	Dosierung der Aminochinoline	61
4.1.2.	Applikation der Aminochinoline	61
4.2.	<u>Auswertung und Ergebnisse der Tierversuche</u>	62
4.2.1.	Darstellung der Blutspiegelkurven	62
4.2.2.	Pharmakokinetische Daten aus den Blutspiegelkurven ..	63
4.2.3.	Nicht lineare Blutspiegelkurven	64

4.2.4.	Zusätzliche Auswertung der erhaltenen Gas-Chromatogramme	65
4.2.4.1.	Retentionszeiten der untersuchten Aminochinoline	65
4.2.4.2.	Nicht identifizierte Metaboliten	66
4.3.	<u>Reproduzierbarkeit der Bestimmung von</u> <u>Blutspiegelkurven</u>	69
4.4.	<u>Versuche zum Nachweis eines 5,6- bzw. 5,8-Chinolin-</u> <u>chinons im biologischen Material nach Applikation eines</u> <u>6-Aminochinolins</u>	70
4.4.1.	Vergleichssubstanzen	70
4.4.2.	Extraktionsbedingungen für das 5,6-Chinolinchinon aus biologischem Material	71
4.4.3.	Untersuchung von Urin, Exkrementen, Blut und Leber der Maus nach Applikation von VI	72
4.4.3.1.	Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolin- chinon	72
4.4.3.2.	Identifizierung von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6- chinolinchinon als Phenazinderivat	73
4.4.4.	Ergebnis der Versuche	74
5.	<u>Arbeitsvorschriften für die gas-chromato-</u> <u>graphische Bestimmung von Blutspiegel-</u> <u>kurven</u>	76
5.1.	<u>Allgemeine Angaben</u>	76
5.1.1.	Geräte	76
5.1.2.	Materialien und Reagenzien	78
5.1.3.	Reinigung der Glasgeräte	78
5.1.4.	Herstellung von Trennsäulen	79
5.1.4.1.	Reinigung der Glassäulen	79

5.1.4.2.	Silanisierung der Glassäulen	79
5.1.4.3.	Vorbehandlung des Trägermaterials	80
5.1.4.4.	Füllen der Glassäule mit Trägermaterial	81
5.1.4.5.	Herstellung der Imprägnierlösungen	84
5.1.4.6.	Imprägnieren der Säulenfüllung	84
5.1.4.7.	Konditionierung der Trennsäulen	85
5.2.	<u>Tierversuche</u>	86
5.2.1.	Versuchstiere	87
5.2.2.	Substanzen	87
5.2.3.	Herstellung der Injektionslösungen	87
5.2.4.	Applikation der Injektionslösungen	88
5.2.5.	Blutabnahme	88
5.3.	<u>Gewinnung der Proben</u>	89
5.3.1.	Vorversuche	89
5.3.2.	Hauptversuche	89
5.3.3.	Vergleichsanalysen	90
5.4.	<u>Aufarbeitung der Blutproben</u>	91
5.4.1.	Hämolyse	91
5.4.2.	Extraktion der Aminochinoline	91
5.4.3.	Anreicherung der extrahierten Aminochinoline	92
5.5.	<u>Analyse der Blutproben</u>	94
5.5.1.	Bedingungen für die Gas-Chromatographie	94
5.5.1.1.	Trennsäulen	94
5.5.1.2.	Einstellungen am Gas-Chromatographen	95
5.5.1.3.	Einstellungen am Integrator	97
5.5.1.4.	Allgemeines zur gas-chromatographischen Apparatur ..	98
5.5.2.	Vorbereitung des Gas-Chromatographen zur Analyse ...	98
5.5.3.	Gas-chromatographische Bestimmung	99
5.5.3.1.	Vorversuch	99
5.5.3.2.	Auswertung des Vorversuches	99

5.5.3.3.	Hauptversuch und Vergleichsanalysen	100
5.5.3.4.	Auswertung der Vergleichsanalysen	100
5.5.3.5.	Auswertung des Hauptversuches	101
5.5.4.	Blutspiegelkurve der gesuchten Substanz	101
6.	<u>Weitere analytische und präparative</u> <u>Versuchsbeschreibungen</u>	102
6.1.	<u>Allgemeine Angaben</u>	102
6.2.	<u>Bromierungen</u>	104
	3-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin und 3,7-Dibrom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin	104
	7-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin	106
	3-Brom-6-amino-4,5,8-trimethoxy-chinaldin und 3,7-Dibrom-6-amino-4,5,8-trimethoxy-chinaldin	108
6.2.1.	Bromierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin im Mikrogramm-Bereich	110
6.3.	<u>Derivatisierungen</u>	111
6.3.1.	Derivatisierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin mit Trifluor-essigsäureanhydrid	111
6.3.2.	Derivatisierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin mit Heptafluor-buttersäureanhydrid	111
6.4.	<u>Entmethylierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin</u>	111

6.5.	<u>Extraktion von Urin, Exkrementen, Blut und Leber von Mäusen zum Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl- 5,6-chinolinchinon</u>	113
6.6.	<u>Bildung der Pyrido- [3,2-a] -phenazin-Derivate von 5,6-Chinolinchinonen im Nanogramm-Bereich</u>	115
6.7.	<u>Oxydation von Aminochinolinen mit Kaliumhexacyano- ferrat (III)</u>	115
6.7.1.	Bestimmung des pK_S - Wertes	115
6.7.2.	Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung	116
6.8.	<u>8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy- chinolin</u>	117

Literaturverzeichnis	120
----------------------------	-----

ooOoo

ZUSAMMENFASSUNG

Gegen Malaria wirksame, basisch alkylierte Aminoquinoline wurden nach intraperitonealer Applikation aus dem vereinigten Blut von fünf Mäusen, nach Zugabe eines inneren Standards und Alkalisierung mit Benzyltrimethylammoniumhydroxid, extrahiert, in speziell hierfür konstruierten Gläsern durch Ausschüttelung im Ultraschallbad in 25 µl Toluol angereichert und gas-chromatographisch mit einem stickstoffselektiven Detektor zusammen mit einem Integrator mit abfallend tangentialer Auswertung bestimmt. Der niedrigste bestimmte Blutspiegel betrug 1 ng Plasmochin^(R) pro ml Blut, wobei 100 pg gas-chromatographisch bestimmt wurden.

Aus den Blutspiegelkurven der ausgewählten acht 6-Aminoquinoline ergab sich ein direkter Zusammenhang zwischen einem raschen Absinken des Blutspiegels und einer möglichen Entstehung eines 5,6-Chinolinchinons im Organismus sowie einer Wirksamkeit gegen Malaria verbunden mit Unverträglichkeit. Diese Wirksamkeit ließ sich auf eine mögliche Bildung einer 5,6-o-chinoiden kombiniert mit einer 5,8-p-chinoiden Struktur zurückführen. Ein 6-Aminoquinolin mit einer möglichen Entstehung eines 5,6-o-Chinons, aber einer blockierten Ausbildung einer 5,8-p-chinoiden Struktur war zwar noch unverträglich, aber nicht mehr wirksam. Nach Applikation von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin konnte aus Urin und Exkrementen von Mäusen das 5,6-Chinolinchinon nachgewiesen werden, ebenso wie nach dem Stehen einer urinhaltigen Lösung dieses 6-Aminoquinolins an der Luft.

Um reproduzierbare Trennsäulen für die Gas-Chromatographie zu erhalten, wurden diese durch Umpumpen einer Imprägnierlösung in der mit Trägermaterial gefüllten Säule in einer selbstgebauten Apparatur hergestellt.

Für einen versuchten Nachweis von 6-Aminochinolinen mit einem ^{63}Ni Elektroneneinfang-Detektor wurden durch Bromierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin und 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin mit Dibromisocyanursäure 3-Brom- und 3,7-Dibrom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin sowie 7-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin hergestellt.

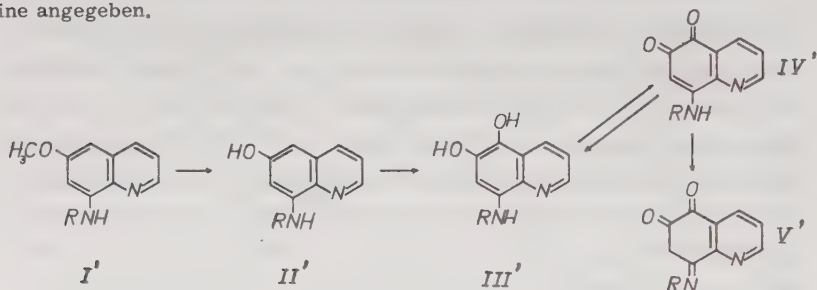
1. Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnis der Untersuchungen

1.1. Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese

Im Rahmen der umfangreichen Arbeiten auf dem Gebiet der malariawirksamen Chinoline, bei denen nur Derivate von 4- und 8- sowie vereinzelt von 6-Aminochinolinen eine Wirkung gegen Plasmodium cathemerium am Kanarienvogel zeigten, hatte S c h ö n h ö f e r ⁹⁹⁾ 1942 seine Chinon-Hypothese veröffentlicht, die sich in der Folgezeit bei der Auffindung von malariawirksamen Arzneimitteln bewährte ³²⁾. Nach dieser Arbeitshypothese können nur solche Aminochinoline eine Wirkung gegen Malaria entfalten, deren substituierte sekundäre Aminogruppe sich in ortho- oder para-Stellung zum Chinolinstickstoff befindet und die Möglichkeit der Ausbildung einer chinoiden Struktur zum Chinolinstickstoff besitzt, also in 4-, 8- oder 6- Stellung. Bei den 4-Aminochinolinen bleibt diese chinoide Struktur auf den Pyridinring beschränkt und liegt auf Grund der bekannten Tautomerie zwischen 4-Aminochinolin und 4-Iminochinolon stets vor; diese wurde von S c h ö n h ö f e r als mögliche in vivo malariawirksame Form angesehen. Bei den 6- und 8-Aminochinolinen wird diese chinoide Struktur nur durch eine Oxydation erreicht. Diese im Organismus möglicherweise nur vorübergehende Umwandlung zu den entsprechenden Chinolinchinonen sah S c h ö n h ö f e r als die notwendige Voraussetzung für eine Malariawirksamkeit der 6- und 8-Aminochinoline an. Eine Bestätigung der S c h ö n h ö f e r 'schen Hypothese brachten die Auffindung des nur in vitro wirksamen 5,6-Chinolinchinons von Plasmodium ^{58, 59)} und des 5,6-Chinolinchinons von Pentaquine ¹⁰⁵⁾ und die vergleichenden in vitro Versuche mit synthetisierten Chinolinchinonen ^{28, 47)}.

1.2. Theorie über die Wirkungsweise der 8-Aminochinoline

Aufbauend auf den Untersuchungen von Smith¹⁰⁵⁾ und in Übereinstimmung mit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese wurde von Tarlov¹¹⁰⁾ ein Schema für den Metabolismus der 8-Aminochinoline angegeben.



Nach diesem Schema erfolgt nach Entmethylierung der 6-Methoxy-gruppe eine Hydroxylierung der 5-Stellung mit anschließender Oxydation zum 5,6-Chinon. Das Redoxsystem aus III' und IV' könnte dabei als Elektronenakzeptor bei der Oxydation im Erythrozytenstoffwechsel auftreten und die Nebenwirkungen der Hämolyse und Methämoglobinbildung hervorrufen^{96, 13)}. Die Tatsache, daß in der Reihe der 8-Aminochinoline eine Steigerung der Wirksamkeit häufig eine Erhöhung der Giftigkeit bedingte^{20, 121)}, veranlaßte Brodie zu der Vermutung, daß derselbe Metabolit sowohl die toxische als auch die therapeutische Wirkung hervorrufen könnte¹³⁾.

1.3. 6-Aminochinoline

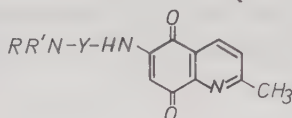
Während in die Therapie bisher nur 4- und 8-Aminochinoline eingeführt wurden, von denen noch heute Resochin^(R) und Primaquine^(R) die gebräuchlichsten Malariamittel darstellen, fand 1961 Schönhöfer das erste bei Kanarienvogelmalaria gut wirksame 6-Aminochinolin,

6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.8-dimethoxy-chinolin¹⁰⁰⁾, welches für Mäuse sehr toxisch war. Durch Einführung einer Methylgruppe in 2-Stellung gelang S c h ö n h ö f e r eine Verminderung der akuten Toxizität am Kanarienvogel; bei Säugetieren war diese, B 505 genannte Verbindung (VIII, Tab. 1) jedoch noch so unverträglich, daß sie für eine weitere Prüfung ausschied³⁹⁾. Die Einführung einer weiteren Methylgruppe in 4-Stellung (VI) von N i c k e l^{39,83)} in Fortführung der Arbeiten von S c h ö n h ö f e r führte zu einer solchen Verringerung der akuten Toxizität bei Mäusen, daß Versuche mit Mäusen möglich wurden. In der Folgezeit wurden die verschiedensten Derivate der 6-Amino-chinoline durch Änderung des Substitutionsmusters im Pyridinring^{83,4,90,123)}, in der Seitenkette^{101,90,34)} und in der 5- und 8-Stellung des Benzolringes⁵¹⁾ durchgeführt und am hiesigen Institut synthetisiert und von E. F i n k einer orientierenden Prüfung auf Wirksamkeit bei Kanarienvogel- und Mäusemalaria sowie Verträglichkeit unterworfen.

1.4. Theorie über die Wirkungsweise der 6-Aminochinoline

Basisch alkylierte 6-Amino-5.8-dimethoxy-chinoline wirken bei der experimentellen Vogel- und Nagetiermalaria sowohl kausalprophylaktisch als auch schizontozid^{34,39,83,84)}. Mit diesen Eigenschaften scheint die Verbindungsklasse zwischen den malariawirksamen 8- und 4-Aminochinolininen zu stehen³⁹⁾. Auf Grund der Wirksamkeit der Verbindung 6-(3-Diäthylamino-propylamino)-5.8-dimethoxy-chinaldin, die sich nur in ihrer Seitenkette vom B 505 (VIII) unterscheidet, gegen bestimmte, für Cycloguanil und 4.4'-Sulfonyldianilin (DDS) resistente Stämme von P. berghei und der nur etwas schwächeren Wirkung gegen für Resochin resistente Stämme folgerte E l s l a g e r³⁴⁾ für basisch alkylierte 6-Aminochinoline einen anderen Wirkungsmechanismus als für 4-Amino-

chinoline, Er postulierte deshalb in Analogie zu den 8-Aminochinolinen und im Einklang mit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese als aktiven Metaboliten das 5,8-Chinolinchinon



ebenso wie Nickel⁸³⁾.

Porter und Mitarbeiter⁸⁹⁾ konnten zudem erst kürzlich zeigen, daß malariewirksame 6-Alkylamino-5,8-chinolinchinone in vitro die NADH-Oxydase und Succinat-Oxydase aus Rinder-Mitochondrien hemmen, wobei die Hemmung der NADH-Oxydase sich durch Zugabe von Coenzym Q₁₀ wieder aufheben ließ.

1.5. Bekannter Einfluß von Substituenten in 4- und 8-Stellung der 6-Amino-2,4-dimethyl-chinoline auf die biologische Aktivität

Bei den 8-Amino-6-methoxy-chinolinen stellte Coatney^{20a)} fest, daß bei Chlor- oder Methyl-Substitution in 5-Stellung die Wirksamkeit gegen *P. gallinaceum* im Hühnchen stark abnahm, ebenso bei Ersatz der Methoxy-gruppe in 6-Stellung durch die beiden Substituenten, wobei die hiermit verbundene Verbesserung der Verträglichkeit nicht in dem Maße erfolgte, in dem die Wirksamkeit vermindert wurde. Blanchard⁷⁾ vermutete nach der gleichen Beobachtung bei Substitution mit einem Phenylrest in 5-Stellung, daß ein Substituent in 5-Stellung bei 8-Amino-6-methoxy-chinolinen die Wirkung herabsetzt oder aufhebt, wenn derselbe eine Chinonbildung in vivo erschwert oder verhindert. Ausgehend von diesen Ergebnissen und der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese

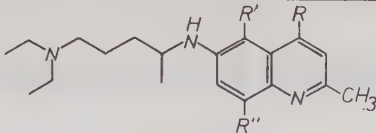
stellte H ö l z e l ⁵¹⁾ durch Änderung des Substitutionsmusters in 5- und 8-Stellung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-chinolin (I) (Tab. 1) und 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4-methoxy-chinaldin Verbindungen her, deren mögliche Oxydation im Organismus zum 5,8-Chinolinchinon erleichtert, erschwert oder verhindert ist. Dabei zeigte sich, daß entsprechend der Annahme einer Erschwerung oder Hinderung der 5,8-Chinolinchinon-Bildung, die 6-Aminochinoline I, IV, V und I mit R = OCH₃ unwirksam waren, während II, III, III mit R' = N $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ O, III mit R = OCH₃ und II mit R = OCH₃ unterschiedliche Wirksamkeit zeigten. Bemerkenswerterweise verschwand in den Verbindungen I mit R' = NHCOCH₃ und I mit R'' = OH die in vivo Wirksamkeit, obwohl I mit R'' = OH als eine Verbindung angesehen wurde, welche eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit für eine 5,8-Chinolinchinon-Bildung besitzen sollte ⁵¹⁾. Dieses Verhalten von I mit R'' = OH erinnerte an das Verhalten des in 6-Stellung entmethylierten Plasmochins (XII mit HO- in 6-Stellung), welches zwar in vivo unwirksam, aber in vitro wirksam war ⁴⁷⁾.

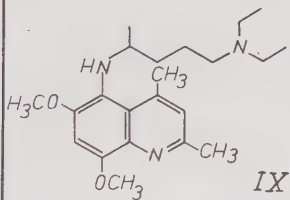
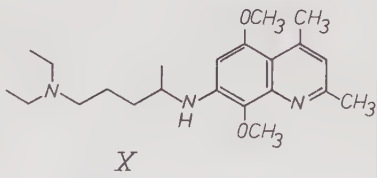
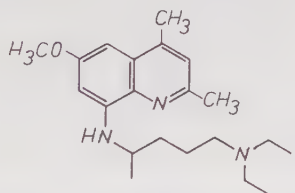
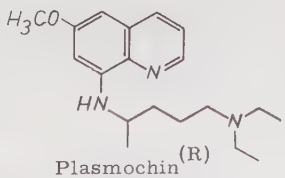
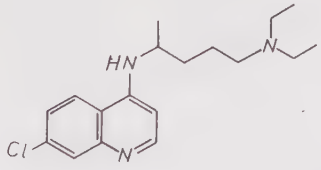
An Hand einer empfindlichen gas-chromatographischen Bestimmungs- methode für malariawirksame Aminochinoline wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit zwischen den Blutspiegelkurven und der Malaria- wirksamkeit verschiedener 6-Aminochinoline ein Zusammenhang besteht.

1. 6. Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen

Neben den Blutspiegeln des 4-Aminochinolins Resochin^(R) (XIII) und des 8-Aminochinolins Plasmochin^(R) (XII) als Vergleichssubstanzen, wurden von mir im Hinblick auf die Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese die Blutspiegel der basisch alkylierten Aminochinoline I bis XI (Tab. 1) nach der in Kap. 5 angegebenen Arbeitsvorschrift bei der Maus bestimmt. Bei der Auswahl der untersuchten Aminochinoline beschränkte ich mich im wesentlichen auf Verbindungen mit Methyl-gruppen in 2- und 4-Stellung, da sich diese von den zahlreichen im Pyridinring verschieden substituierten 6-Aminochinolinen in ihrem biologischen Verhalten am günstigsten erwiesen.

Tabelle 1: Untersuchte Aminochinoline

			
Verbindung	R	R'	R''
I	CH ₃	H	H
II	CH ₃	OCH ₃	H
III	CH ₃	H	OCH ₃
IV	CH ₃	OCH ₃	Cl
V	CH ₃	CH ₃	OCH ₃
VI	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃
VII	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
VIII	H	OCH ₃	OCH ₃

 IX	 X
 XI	 XII Plasmochin (R)
 XIII	Resochin (R)

1. 6. 1. Blutspiegelkurven der untersuchten Aminochinoline

In den Abb. 1, 2 und 3 sind die Blutspiegelkurven in der Maus auf-
gezeichnet in der von D o s t ²⁶⁾ angegebenen, im Kap. 4. 2. 1. be-
schriebenen Weise.

1. 6. 2. Interpretation der Blutspiegelkurven

Bei Vergleich der erhaltenen Blutspiegelkurven mit den von E. F i n k
am hiesigen Institut bei der orientierenden biologischen Prüfung gewon-
nenen Daten fiel beim ersten Blick auf, daß rasches Absinken des Blut-
spiegels mit Malariawirksamkeit einhergeht, und daß die Verträglichkeit
der Verbindungen umso mehr zunimmt, je langsamer die Blutspiegel ab-
sinken. Nun wurde die theoretische Möglichkeit der Bildung eines 5.6-o-
oder 5.8-p-Chinons durch Umwandlung im Organismus gemäß der
Schönhöfer'schen Chinonhypothese bei den einzelnen Verbindungen mit
dem Absinken des Blutspiegels verglichen. Dabei zeigte sich ein direkter
Zusammenhang zwischen dem Absinken des Blutspiegels und der Möglich-
keit zur Entstehung eines o-Chinons. So wurden die Verbindungen I, III
und V sehr langsam ausgeschieden, weil sie in 5-Stellung keine Sauer-
stofffunktion besitzen und somit die Bildung eines 5.6-o-Chinons im Or-
ganismus bei I und III sehr verlangsamt und bei V blockiert ist.

Verbindungen dagegen, die in 5-Stellung eine Methoxy-gruppe besitzen,
können nach Entmethylierung rasch ein 5.6-o-Chinon bilden und ver-
schwinden mehr oder minder schnell aus dem Blut. B 505 (VIII) mit der
kürzesten biologischen Halbwertszeit der untersuchten Aminochinoline
stellt dabei auch die unverträglichste Substanz dar. Verbindung V dage-
gen, bei der keine o-Chinon-Bildung möglich ist, stellt die am weitaus

Abbildung 1:

Blutspiegelkurven aller nach Kap. 5. 3. - 5. 4. untersuchten Aminochinoline
der Tab. I in der Maus.

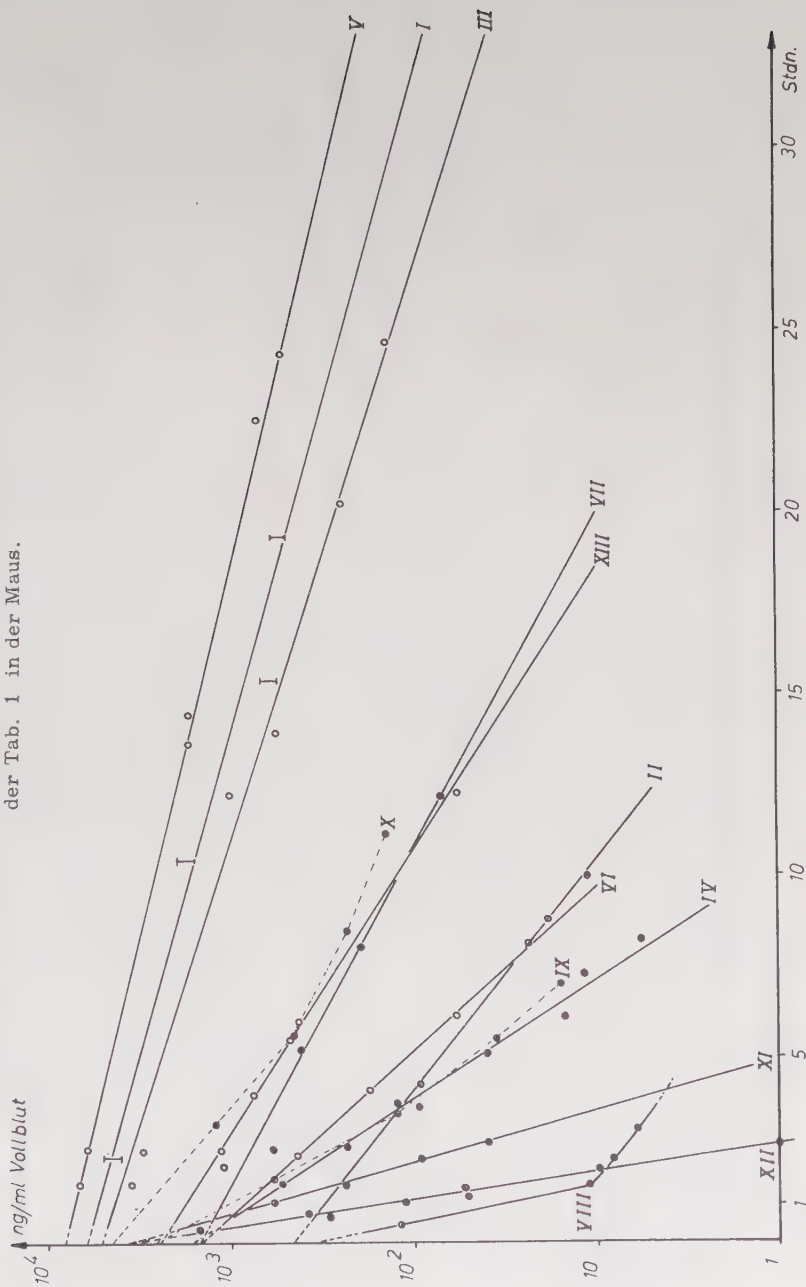


Abbildung 2:

Blutspiegelkurven der untersuchten 6-Aminochinoline in der Maus.

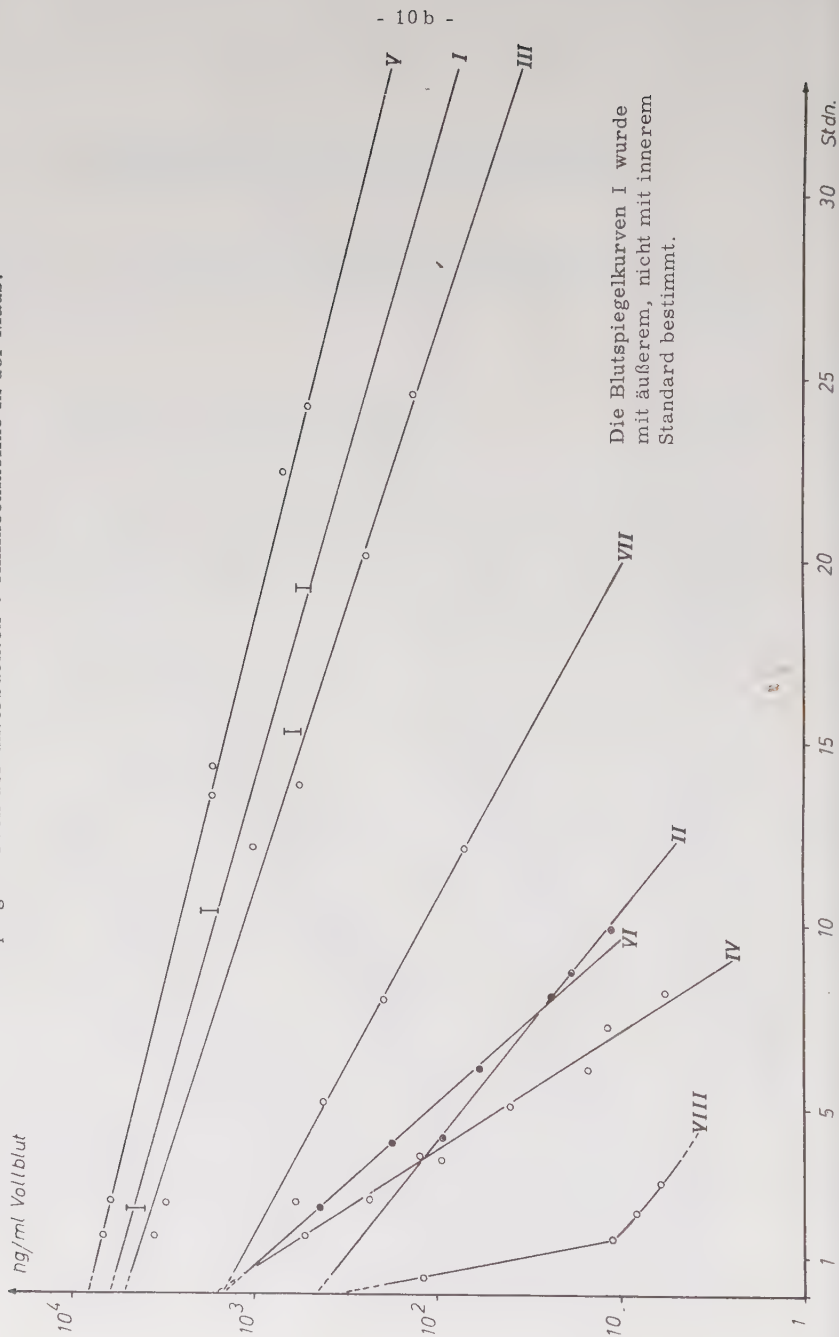
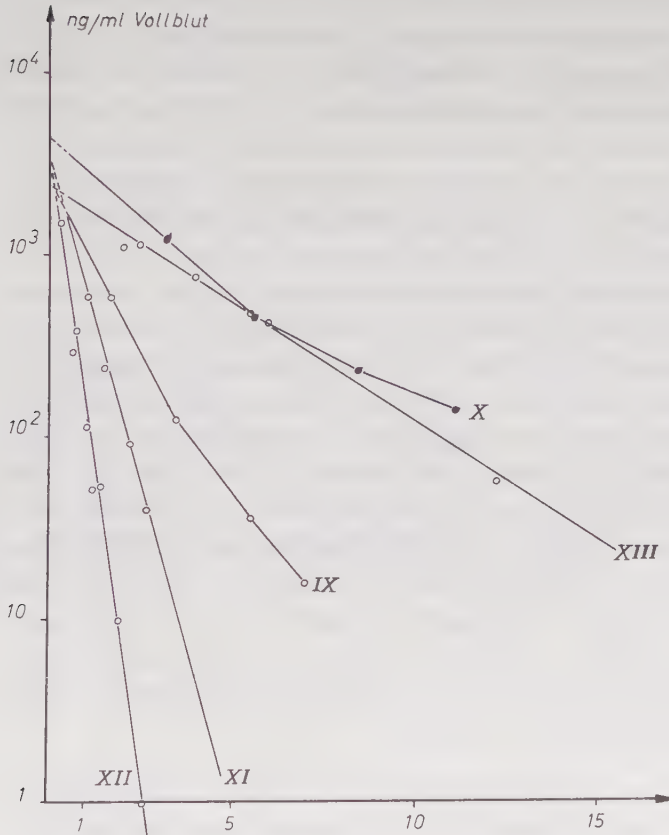


Abbildung 3:

Blutspiegelkurven des 4-Aminochinolins
Resochin (XIII), der 8-Aminochinoline
Plasmochin (XII) und XI sowie des
5-Aminochinolins IX und des 7-Amino-
chinolins X in der Maus.



verträglichste Substanz dar und noch etwa beobachtbare, geringe biologische Effekte kommen ausschließlich dem unveränderten basisch alkylierten 6-Aminochinolin zu. Wurde nun die Malariawirksamkeit der 6-Aminochinoline mit dem Abfall der Blutspiegelkurven, ausgedrückt durch ihre biologische Halbwertszeit verglichen, so ergab sich, daß im allgemeinen alle Verbindungen der Tabelle 1 eine bemerkenswerte Malariawirksamkeit zeigten, deren biologische Halbwertszeit unter drei Stunden lag. Die Ausnahme bildete die völlig unwirksame Verbindung IV, welche nahezu das gleiche Absinken des Blutspiegels zeigte, wie das höchstwirksame VI. Diese Tatsache konnte mit der zusätzlichen Überlegung erklärt werden, daß in IV der Chlor-Substituent in 8-Stellung die Ausbildung einer bei VI leicht möglichen p-chinoiden Struktur blockiert. In Übereinstimmung damit zeigen die Verbindungen I und III mit einer oben erwähnten sehr verlangsamten Ausbildung einer o-chinoiden Struktur und damit einhergehend auch einer sehr verlangsamten Ausbildung einer p-chinoiden keine Malariawirksamkeit, ebenso wie die Verbindung V mit blockierter Ausbildung einer o- und p-chinoiden Struktur. Zur Überprüfung vorstehend erwähnter Zusammenhänge zwischen biologischer Halbwertszeit und o-Chinon-Bildung sowie Malariawirksamkeit und Ausbildung einer p-chinoiden Struktur wurden die Blutspiegel des 5-Aminochinolins IX¹²²⁾ und des 7-Aminochinolins X¹⁰²⁾ bestimmt, welche gemäß der Schönhöfer'schen Chinonhypothese keine Malariawirksamkeit zeigten. Die Blutspiegelkurven von IX und X verliefen zwar unerwarteterweise nicht streng linear, aber deuteten auf etwa dieselbe Halbwertszeit wie die des höchstwirksamen 6-Aminochinolins VI hin.

Der direkte Zusammenhang zwischen dem Absinken des Blutspiegels und der Bildung eines o-Chinons zeigt sich besonders deutlich bei der Blutspiegelkurve des Plasmochins (XII), für welches die Bildung eines o-Chinons nachgewiesen wurde^{58, 59)} und bei der Blutspiegelkurve des "dimethylierten" Plasmochins XI⁵¹⁾. Bei diesen 8-Aminochinolen

XII, XI erfolgt im Gegensatz zu den in 5-Stellung ebenfalls nicht substituierten 6-Aminochinolinen I und III die Bildung eines o-Chinons im Organismus sehr rasch.

Daß die Möglichkeit zur Bildung einer o-chinoiden sowie einer p-chinoiden Struktur bei 6-Aminochinolinen eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für eine Malariawirksamkeit darstellt, wird durch die Unwirksamkeit der in 7-Stellung halogenierten Verbindungen 7-Chlor-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-chinaldin (VIII mit Cl in 7-Stellung)⁴⁾ sowie der Bromderivate XIV und XV (s. Tab. 6) bewiesen. Inwieweit außer Cl und Br auch andere Substituenten in 7-Stellung die Malariawirksamkeit vernichten, muß offen bleiben, jedoch darf vermutet werden, daß für ein tautomeriefähiges System Wasserstoff in 7-Stellung den optimalen Substituenten darstellt. Damit dürften die Verhältnisse bei den 6-Aminochinolinen denen der 8-Aminochinoline gleichen, nachdem bereits Schönhöfer⁹⁹⁾ darauf hingewiesen hat, daß eine Substitution in 7-Stellung durch eine Methoxy-gruppe die Wirksamkeit völlig zum Verschwinden bringt.

In Tab. 2 sind die aus den Blutspiegelkurven nach Dost²⁶⁾ in Kap. 4.2.2. ermittelten Werte für Halbwertszeit und Verteilungsvolumen angegeben.

Tabelle 2:

Aus den Blutspiegeln bei der Maus nach D o s t ²⁶⁾ berechnete
Werte für biologische Halbwertszeit $t_{1/2}$ und Verteilungs-
volumen V.

Verbindung	Dosis [mg/kg]	a ^{x)} [µg/ml]	V [ml]	$t_{1/2}$ [Std.]
V	80,0	8,0	10	6,1
I	40,0	6,1	6,5	5,4
III	40,0	5,1	8	4,7
VII	20,0	1,5	8	2,8
XIII	20,0	2,4	8	2,3
II	40,0	0,46	87	2,0
X	40,0	4,5	9	1,7 - 3,0
VI	20,0	1,45	14	1,4
IX	40,0	2,6	15,5	0,8 - 1,2
IV	40,0	1,6	25	1,0
XI	5,0	0,36	14	0,4
VIII	3,75	0,36	10	0,3
XII	5,0	0,36	14	0,2

x) a = extrapolierter Blutspiegelwert zur Zeit $t = 0$ ²⁶⁾

1.6.3. Folgerungen

Die vorstehend behandelten Zusammenhänge lassen für die Malariawirksamkeit der basisch alkylierten 6-Amino-2,4-dimethyl-chinoline die nachstehenden vier Forderungen angebracht erscheinen:

- 1.) Die Malariawirksamkeit ist mit der Bildung eines 5,6-o-Chinolin-chinons bzw. einer 5,6-o-chinoiden Struktur verknüpft.
- 2.) Eine Verhinderung einer Oxydation in 8-Stellung zur Bildung einer 5,8-p-chinoiden Struktur bedeutet Unwirksamkeit trotz möglicher Bildung eines o-Chinons.
- 3.) Rasches Absinken des Blutspiegels ist an die Bildung eines o-Chinons gebunden.
- 4.) Wenn sowohl die Bildung einer 5,6-o-chinoiden als auch einer 5,8-p-chinoiden Struktur möglich ist, muß das Molekül wirksam sein, sofern die 7-Stellung nicht substituiert ist.

Nach diesen Überlegungen war es naheliegend zu versuchen, ein 5,6-Chinolinchinon im tierischen Organismus nachzuweisen.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Kap. 4.4.4. beschrieben.

1.7. Oxydierbarkeit durch Kaliumhexacyanoferrat (III)

Auf Grund der von Nickel⁸⁵⁾ festgestellten Oxydierbarkeit der nicht protonierten Verbindung VI und anderer 6-Aminochinoline mit Kaliumhexacyanoferrat (III) wurde versucht, die chemische Oxydierbarkeit der untersuchten Verbindungen mit ihrem biologischen Verhalten zu vergleichen. Die Substanzen wurden nach der in Kap. 6.7. angegebenen Arbeitsweise bei einem bestimmten pH-Wert, der eine meßbare Oxydationsgeschwindigkeit erlaubte und im allgemeinen 1,5 Einheiten⁵⁰⁾ unter dem pK_S -Wert lag, oxydiert. Die Ergebnisse sind in der Tab. 3 angegeben^{50a)}. Die bei der Oxydation der Aminochinoline erhaltenen Lösungen wurden mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase entsprechend Kap. 4.4.3.1. dünn-schicht-chromatographisch und der i. Vak. erhaltene, in Toluol aufgenommene Rückstand gas-chromatographisch auf evtl. gebildetes 5,6-Chinolinchinon untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt. In Tab. 5 ist außerdem eine Aufgliederung der untersuchten Aminochinoline in Bezug auf ihre mögliche Oxydierbarkeit zu o- bzw. p-Chinon im Organismus durchgeführt und die biologische Halbwertszeit der Geschwindigkeit der Oxydation durch Kaliumhexacyanoferrat (III) gegenübergestellt.

Tabelle 3 :

Geschwindigkeit der Oxydation $t_{\text{Ox.}}$ der untersuchten Amino-
chinoline durch Kaliumhexacyanoferrat (III).

Verbin- dung	pK_S Bestimmung:		$t_{\text{Ox.}} (pK_S - 1,5)$ Bestimmung:		$t_{\text{Ox.}}$ ($pK_S - 0,8$)	$t_{\text{Ox.}}$ (pK_S)	$t_{\text{Ox.}}$ ($pK_S + 1,0$)
	1.	2. 50a)	1.	2. 50a)			
X	7,92	8,12	8	5,6			
VII	7,03	7,36	16	11,8			
VI	6,46	6,68	12,8	11,8			
VIII	5,93	5,97	27,2	33,6			
II	6,74	6,93	62	95	16,6		
XI	5,06	5,27	128	∞	33,2		
III	6,60	7,22	∞	∞	38,7		
IX	6,55	6,67	∞	170	126		
XII	3,76	3,92	28	∞	88	25,4	
IV	5,03	5,31	139	∞	∞	77	
V		7,25		∞	∞		70
I		7,26		∞	∞	109	

Tabelle 4 :

Oxydation der Aminochinoline mit Kaliumhexacyanoferrat (III)
und Untersuchung auf gebildetes 5,6-Chinolinchinon.

5,6-Chinolinchinon

nachweisbar bei : II, VI, VII, VIII, IX, XI, XII

nicht nachweisbar bei : I, III, IV, V, X

Tabelle 5 :

Möglichkeiten der Oxydation der untersuchten Aminochinoline im Organismus und Vergleich der biologischen Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit der Geschwindigkeit der Oxydation $t_{Ox.}$ durch Kaliumhexacyanoferrat (III).

Möglichkeit der o- und p- Chinon-Bildung	Amino-chinoline	$t_{1/2}$ in Stdn.	$t_{Ox.}$ in Min. ($pK_S - 1,5$)
o- und p- Chinon-Bildung erleichtert	VIII	0,3	33 ^x
	IX	0,8 - 1,2	170 ^x
	VI	1,4	12 ^x
	VII	2,8	12 ^x
o-Chinon erleichtert p-Chinon erschwert	II	2,0	95 ^x
o-Chinon erschwert p-Chinon erleichtert	X	1,7 - 1,8	6 ^{xx}
o- und p-Chinon-Bildung erschwert	I	5,4	- 109 (pK_S) ^{xx}
	III	4,7	- 39 ($pK_S - 0,8$) ^{xx}
o-Chinon erleichtert p-Chinon verhindert	IV	1,0	- 77 (pK_S) ^{xx}
o- und p-Chinon-Bildung verhindert	V	6,1	- 70 ($pK_S + 1,0$) ^{xx}

x 5,6-o-Chinon nachgewiesen (Tab. 4)

xx 5,6-o-Chinon nicht nachgewiesen (Tab. 4)

Zwischen der biologischen Halbwertszeit, bedingt durch die Bildung eines o-Chinons im Organismus, und der Geschwindigkeit der Oxydation durch Kaliumhexacyanoferrat (III) besteht nur in einzelnen Fällen Übereinstimmung. Während die Verbindungen VIII, VI und VII zwar schnell chemisch oxydiert und besonders bei VIII o-Chinon nachgewiesen werden kann, wird bei der sehr schnellen Oxydation von X kein o-Chinon gefunden. Unerwarteterweise lassen sich die 8-Aminochinoline XII und XI nur sehr langsam oxydieren, obwohl bei XII das basisch alkylierte o-Chinon im Organismus gebildet wird ^{58,59)}. Bei den Verbindungen I, III und V, mit der höchstens biologischen Halbwertszeit wird beim Oxydationsversuch nur sehr wenig Kaliumhexacyanoferrat (III) verbraucht und kein o-Chinon gefunden. Auf einer 100 cm langen Trennsäule mit 2,5 % OV-17 zeigte sich im Gas-Chromatogramm bei 250° bei den Verbindungen III und V eine Retentionszeit ⁶⁰⁾ von $t_S = 2,16$ Min. und $t_S = 2,86$ Min. Nach der Oxydation erhielt man für beide Verbindungen einen symmetrischen Peak mit der Retentionszeit $t_S = 5,15$ Min.. Das 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolinchinon besitzt dagegen eine Retentionszeit von $t_S = 0,64$ Min.. Die geringe Übereinstimmung der biologischen und chemischen Oxydierbarkeit mag daran liegen, daß die unterschiedlichen chemischen Oxydationsgeschwindigkeiten der untersuchten Aminochinoline in erster Linie dadurch erhalten wurden, daß, um eine vergleichbare und meßbare Geschwindigkeit zu erhalten, die Oxydationsbedingungen entsprechend den pK_S - Werten für die einzelnen Verbindungen gleichgehalten wurden. Während bei der chemischen Oxydation immer nur ein vorbestimmter Anteil der vorliegenden Verbindung in der nicht protonierten, oxydierbaren ⁸⁵⁾ Form vorliegt, entfällt beim biologischen pH diese Begrenzung und die Geschwindigkeit der Oxydation dürfte von anderen Einflüssen wie der Art der Substituenten, der Bindung am Enzym und der vorhandenen Enzymmenge bestimmt werden. Weiterhin könnte ein anderer Reaktionsmechanismus bei der Oxydation im Körper die Unterschiede erklären.

2. Wahl der Analysenmethode

2.1. Bisher angewandte Methoden zur quantitativen Bestimmung der 4-Aminochinoline Resochin und Hydroxychloroquine und der 8-Aminochinoline Primaquine, Plasmochin und Pentaquine im biologischen Material.

2.1.1. Photometrie im sichtbaren Licht

Für eine Photometrie im sichtbaren Licht müssen die genannten Substanzen erst in farbige Verbindungen umgewandelt werden.

Mit verschiedenen Alkaloid-Reagenzien entstehen gefärbte Fällungen, die turbidimetrisch gemessen werden können. Dubost bestimmte so Plasmochin im Urin³⁰⁾. Ebenso konnte Resochin im Blut⁹⁸⁾ ab 200 ng/ml und im Urin^{41,42)} ab 1000 ng/ml ermittelt werden.

Als Farbstoffkomplex extrahierte und bestimmte Mc Chesney⁷¹⁾ Resochin aus Urin und Faeces.

Die Fähigkeit der 8-Aminochinoline mit diazotierter Sulfanilsäure zu kuppeln, wurde von Brodie¹²⁾ zu einer Bestimmungsmethode für Plasmochin im biologischen Material ausgearbeitet, deren Nachweisgrenze bei 250 ng liegt. Zubrod¹²⁴⁾ bestimmte nach dieser Methode Plasmochin im Blutplasma des Menschen und seine Verteilung im Hund. Beim Affen ermittelte nach derselben Arbeitsvorschrift Smith¹⁰⁵⁾ im Urin¹⁴⁾ C-markiertes Pentaquine, Elderfield³³⁾ in den Exkrementen¹⁵⁾ N-markiertes Pentaquine als unverändert ausgeschiedenen Anteil, Hughes⁵³⁾ dagegen verschiedene 8-Aminochinoline im Blutplasma.

Nach Strufe¹⁰⁸⁾ kann Resochin aus Urin mit Aconitinsäure als roter Farbstoff mit einer Nachweisgrenze von 5000 ng kolorimetriert werden.

2.1.2. UV - Spektroskopie

Nach D r a k e ²⁷⁾ ist von den verschiedenen Maxima im Absorptions-
spektrum des Resochins dasjenige bei 343 nm für eine quantitative Be-
stimmung geeignet. Es wurde deshalb nach Extraktion aus biologischem
Material häufig UV-spektroskopisch, aber mit geringer Empfindlichkeit
gemessen. R o b i n s o n ⁹⁵⁾ und W a a r s t ¹¹⁷⁾ bestimmten so
den Gehalt im Blut, P r o u t y ⁹¹⁾ und M o n n e t ⁷⁹⁾ außerdem
die Verteilung in den Geweben und S t e p h a n ¹⁰⁷⁾ die Ausscheidung
im Urin. Als Nachweisgrenze wurden 1000 ng ⁹¹⁾ bzw. 10 000 ng ⁷⁹⁾
pro Probe angegeben.

2.1.3. Fluorometrie

Die erste fluorometrische Bestimmungsmethode für Aminochinoline wurde
von I r v i n g ⁵⁴⁾ für Plasmochin in konz. Schwefelsäure für eine Min-
destmenge von 100 ng beschrieben. Das kurzwelliger fluoreszierende
Resochin dagegen konnte vorerst nur nach starker UV-Bestrahlung indirekt
fluorometrisch von B r o d i e ¹¹⁾ mit einer Nachweisgrenze von 100 ng
bestimmt werden. A l v i n g ¹⁾ und B e r l i n e r ⁶⁾ ermittelten
nach dieser Methode Plasmaspiegel beim Menschen. Nachdem U d e n -
f r i e n d ¹¹³⁾ mit einer verbesserten Apparatur die Meßbedingungen und
die Nachweisgrenze von 50 ng/ml reiner Meßlösung für eine direkte Fluo-
reszenzmessung von Resochin und Plasmochin festgelegt hatte, folgte an-
schließend die Bestimmung von Resochin in biologischem Material ^{35, 73, 43)}.
Die Extraktion erfolgte nach der von B r o d i e ^{11, 10)} ausführlich an-
gegebenen Methode, gemessen wurde in ammoniakalischer Lösung. Bei der
von F o u r n e l ⁴⁰⁾ beschriebenen Arbeitsweise wurde Resochin aus
Vollblut und Gewebe extrahiert und in Butanol die Fluoreszenz gemessen.

2.1.4. Isotopenmarkierung

In den oben erwähnten Untersuchungen von Elderfield³³⁾ und Smith¹⁰⁵⁾ wurde neben dem unveränderten Pentaquine die ausgeschiedene ^{15}N - bzw. ^{14}C -Aktivität bestimmt. Während Macomber⁷⁰⁾ mit ^{14}C -ringmarkiertem Resochin den Gehalt in den Erythrozyten von Mäusen ermittelte, verfolgte Mc Chesney^{76,74)} mit in 3- bzw. 4-Stellung ^{14}C -markiertem Resochin die Verteilung und den Metabolismus im Rhesusaffen.

2.1.5. Chromatographie

Zur Auftrennung, Identifizierung und gelegentlichen quantitativen Bestimmung von Resochin und seiner Metaboliten wurde die Papier-^{67,81)} und Dünnschicht-Chromatographie^{37,74,76,95,17)} verwendet.

Während der Entstehung der vorliegenden Arbeit wurde von Münch⁸⁰⁾ eine Methode zur Bestimmung von malariewirksamen 6-Aminochinolin, Resochin und Primaquine aus biologischem Material ausgearbeitet, bei der nach dünnschicht-chromatographischer Trennung die Fluoreszenzmessung unter Luftabschluß direkt auf der Dünnschichtplatte erfolgte. Eine Peakfläche von 50 ng pro Fleck ließ sich noch sehr gut auswerten. Die Nachweisgrenze lag bei 4 ng pro Fleck oder etwa 10 ng pro ml Blut.

Gas-chromatographische Bestimmungen von malariewirksamen Amino-chinolin sind bisher nur bei Vergiftungsfällen und im Rahmen allgemeiner Anwendungsbeispiele für die Gas-Chromatographie von Arzneimitteln beschrieben.

Van den Heuvel¹¹⁵⁾ und Kaz yak⁶⁵⁾ ermittelten mit 1-proz. reinen Lösungen die Retentionszeiten für Resochin, Plasmochin und Primaquine auf eine 180 cm langen Trennsäule aus Glas mit 1 % SE-30 auf Gas-Chrom P 100-140 mesh bzw. auf Anakrom ABS 100-120 mesh.

Neben UV- und IR-Spektroskopie verwendete Robinson⁹⁵⁾ auch die Gas-Chromatographie, um nach einem tödlichen Vergiftungsfall mit Resochin dessen Verteilung im Körper zu bestimmen. Die Konzentration im untersuchten Material lag zwischen 1,6 und 17,5 µg/g. Er verwendete eine 120 cm lange Trennsäule aus Glas mit 3,8 % SE-30 auf Diatoport S 80-100 mesh. Auf einer gleichartigen Säule bestimmte Mc Chesney⁷⁶⁾ die Endstufe des Metabolismus von Resochin, 7-Chlor-4-(4-carboxy-1-methyl-butylamino)-chinolin nach Umwandlung in den entsprechenden Alkohol als Trimethylsilyläther. Eine von Peters⁸⁷⁾ als sehr empfindlich erwähnte Methode für Resochin von Holtzman⁵²⁾ stellt eine quantitative Bestimmung aus reinen Lösungen dar. Es wurde eine 60 cm lange Trennsäule aus Glas mit 1 % Polyvinylpyrrolidon und 1 % Neopentylglycolsuccinat auf Gas-Chrom P 100-120 mesh bei 220^o Ofentemperatur mit einem Sr-90 Ionisationsdetektor verwendet. Als Nachweisgrenze wurden 5 ng angegeben; ein für 25 ng gezeigtes Chromatogramm jedoch weist erhebliches Grundrauschen auf, das sogar die Peakform beeinträchtigt.

2. 2. Wahl der eigenen Arbeitsweise

Da die malariewirksamen 4- und 8-Aminochinoline Resochin^{111, 67, 74, 75, 76)} und Plasmochin^{13, 58, 59)} sowie Pentaquine¹⁰⁵⁾, einem starken Metabolismus unterliegen, bestand bei den bisherigen Bestimmungen aus biologischem Material die Hauptschwierigkeit in der Abtrennung der unveränderten Substanz von den Metaboliten und sonstigen störenden Begleitstoffen^{9, 72)}. Da der Abbau von basischen, organischen Substanzen im Körper stets zu polareren Verbindungen führt⁹⁾, wurde der dadurch bedingte, niedrigere Verteilungskoeffizient zwischen organischer und wäßriger Phase für die Reinigung des organischen Extraktes

ausgenutzt, indem die Autoren schrittweise den pH-Wert der wäßrigen Lösung bzw. die Polarität des organischen Extraktionsmittels veränderten. Es mußte so für jede Substanz ein eigener spezifischer Extraktionsweg gefunden werden. Man baute meist auf dem von Brodie⁹⁾ beschriebenen Weg auf, der jedoch einigen Arbeitsaufwand erfordert. Hinzu kommt noch, daß eine für Plasma erarbeitete spezifische Extraktionsmethode nicht unbedingt auch für die Extraktion aus Urin und Gewebe spezifisch ist⁹⁾.

Diese Schwierigkeiten umging Münch⁸⁰⁾ am hiesigen Institut dadurch, daß er die vorgereinigten Extrakte, die er nach einem unspezifischen Verfahren erhielt, auf der Dünnschichtplatte trennte. Als nachteilig erwies sich jedoch bei der anschließenden fluorometrischen Bestimmung im Nanogramm-Bereich der stark fluoreszenzlöschende Einfluß von Luftsauerstoff^{80, 31, 114)}.

Bei Verwendung der Gas-Chromatographie erschien es aussichtsreich, die malariawirksamen Aminochinoline aus biologischem Material mit hoher Empfindlichkeit und auf Grund der großen Trennleistung dieses Verfahrens auch aus verhältnismäßig rohen Extrakten bestimmen zu können.

3. Ausarbeitung der eigenen Bestimmungsmethode

3.1. Entwicklung des Extraktionsverfahrens

Vor der Entwicklung eines Extraktionsverfahrens waren einige wesentliche Punkte zu berücksichtigen:

- 1) Auf Grund der Anreicherung von Resochin in den Leukozyten ⁹⁾ und in den Erythrozyten ⁶⁾ von Ratten sollten, da die Verhältnisse bei den zu bestimmenden basisch alkylierten 6-Aminochinolininen nicht bekannt waren, die Blutspiegelwerte nicht im Plasma, sondern im Vollblut bestimmt werden.
- 2) Da einerseits zum Teil sehr wenig Substanz pro ml zu erwarten war und andererseits eine mögliche individuelle Streuung zwischen den einzelnen Tieren auszugleichen war, sollten die einzelnen Blutspiegelwerte immer bei Gruppen von 3 - 5 Tieren bestimmt werden. Es sollte deshalb möglich sein, Proben von 5-6 ml Blut auszuschütteln.
- 3) Das Extraktionsverfahren sollte möglichst einfach und schnell sein und alle zu untersuchenden, malariawirksamen Aminochinoline erfassen.

3.1.1. Gewinnung der Blutproben

Um eine möglichst ausreichende Menge der zu bestimmenden Substanz zu erhalten, war man bestrebt, jedes Versuchstier völlig zu entbluten. Als geeignete Methode zur Blutabnahme erwies sich bei der Maus die Eröffnung des retroorbitalen Venenplexus ³⁸⁾ in Äthernarkose. Im allgemeinen konnten 0,95 - 1,10 ml Blut aufgefangen werden. Beim Kanarienvogel bot sich die rechte Halsvene zur Blutabnahme mit der Recordspritze an, wobei man 0,7 - 1,0 ml Blut erhielt.

Von den verschiedenen Möglichkeiten, die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurden Kaliumoxalat-, Natriumcitrat- und Heparin-Lösungen untersucht. Ammoniumoxalat schied auf Grund des von T r a g e r ¹¹²⁾ beschriebenen Austausches der Ammoniumionen gegen das in den Leukozyten angereicherte Resochin aus, da man dadurch bei Verwendung von Plasma leicht zu hohe Blutspiegelwerte erhalten würde. Heparin erwies sich im praktischen Gebrauch am geeignetsten, da es in beliebig kleinem Volumen zugegeben werden konnte und dadurch die Beschaffenheit des Blutes am wenigsten veränderte. Bei Mäuseblut, das bereits nach Sekunden gerinnt ⁹⁷⁾, mußte jeder Tropfen sofort durch Schwenken mit der vorgelegten Heparin-Lösung vermischt werden. 0,6 mg Heparin Natriumsalz pro ml Blut waren ausreichend, um eine Gerinnung zu verhindern. Um sicher zu gehen, daß vom Zeitpunkt der Blutabnahme an keine Veränderung der Substanz mehr erfolgte, wurde das Blut in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangen und, wenn sich die Extraktion nicht unmittelbar anschloß, sofort in der Tiefkühltruhe eingefroren.

Um eine vollständige Extraktion des Vollblutes zu erreichen, mußte jede einzelne Blutprobe hämolytisiert werden. Am sichersten gelang dies durch Einfrieren in einem Gemisch aus Kohlensäureschnee und Aceton mit anschließendem Auftauen im Ultraschallbad. Dieses Verfahren beanspruchte nur sehr wenig Zeit und erbrachte völlig klares Hämolyseblut.

3.1.2. Wahl des Extraktionsmittels

Bei der Extraktion von basischen Arzneimitteln aus biologischem Material ist nach B r o d i e ⁹⁾ das unpolarste Lösungsmittel, das gerade noch die Substanz vollständig aus der wäßrigen Lösung extrahiert, das Mittel der Wahl. Man erhält hiermit die reinsten Extrakte. Die Chance, Metaboliten der zu untersuchenden Substanz mit zu erfassen, ist jedoch gering, da diese

ebenso wie die Fremdstoffe aus dem biologischen Material weniger lipoid-löslich sind. Reines n-Hexan⁹⁷⁾ und n-Heptan^{48, 9)}, die am meisten für die Extraktion von Aminen verwendeten Lösungsmittel, haben für die zu bestimmenden Aminochinoline ein zu geringes Extraktionsvermögen. Polare Lösungsmittel dagegen extrahieren beträchtliche Mengen Begleitstoffe aus dem biologischen Material^{9, 48, 22)}. Da jedoch ein unspezifisches Verfahren angestrebt wurde, das die einzelnen Substanzen mit ihren eventuell entstehenden Metaboliten erfassen sollte, mußte ein Mittelweg gefunden werden.

Bei der direkten Extraktion ohne vorheriger Abtrennung des Eiweißes bildeten sich sehr stabile Emulsionen, die sich auch durch scharfes Zentrifugieren nicht mehr vollständig trennen ließen. In der organischen Phase blieb meist ein stabiles Gel zurück. Von den verschiedensten untersuchten Lösungsmitteln ließen sich nur die Emulsionen mit Benzol, Toluol oder niederen Kohlenwasserstoffen wieder trennen, ohne daß wesentliche Anteile an Gel in der organischen Phase zurückblieben. Ihr Extraktionsvermögen war jedoch zu schwach bzw. nur für einen Teil der Substanzen ausreichend. Es wurde deshalb so vorgegangen, daß zu n-Hexan, dessen Emulsionen sich am besten trennen ließen, die verschiedensten polaren Lösungsmittel zugemischt wurden. Toluol, Amylalkohol, Diäthyläther, Isopropyläther und besonders Essigsäure-iso-amylester waren hierfür geeignet. Ein Gemisch aus 9 Teilen n-Hexan und 1 Teil Essigsäure-iso-amylester erwies sich in den späteren Versuchen für alle zu bestimmenden, basisch alkylierten Aminochinoline und einige ihrer Metaboliten in seinem Extraktionsvermögen als ausreichend, ohne übermäßig Fremdstoffe aus dem biologischen Material zu extrahieren.

Eine sehr interessante, einfache, von Jain^{55, 56)} beschriebene Methode zur direkten Extraktion verschiedener Arzneimittel aus Blut beim ursprünglichen pH-Wert durch viermaliges, kurzes Rühren mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Äther und Aceton, konnte von mir nicht mit Erfolg angewendet werden.

3.1.3. Wahl der Extraktionsbedingungen

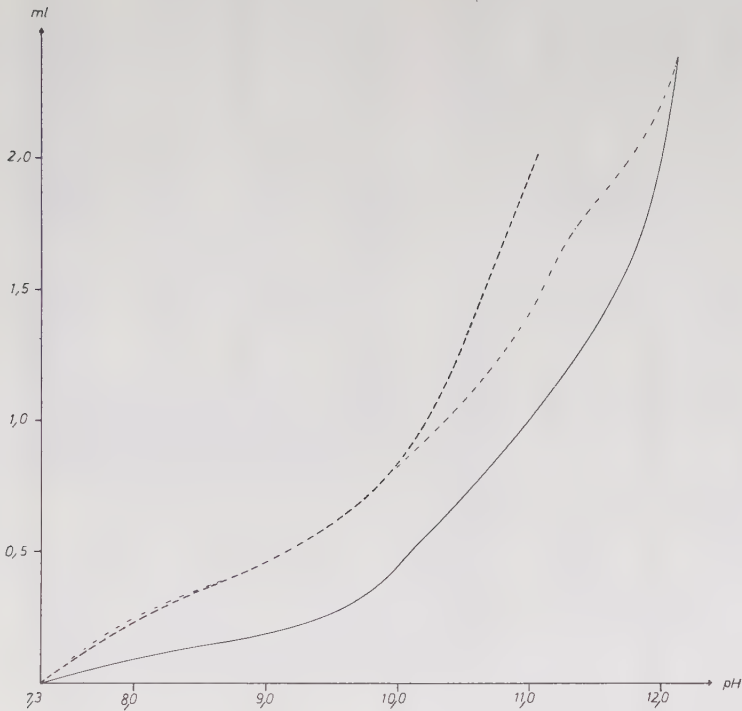
Zur Extraktion von basischen Substanzen muß das biologische Material alkalisch gestellt werden, wobei der pH-Wert der günstigste wäre, bei dem sich die Substanz mit dem gewählten Lösungsmittel gerade noch vollständig aus einer wäßrigen Lösung ausschütteln läßt⁹⁾. Da aber die zu untersuchenden Aminochinoline sich in ihrem pK_S -Wert von 3,7 - 7,9 erstrecken und für die spätere Bestimmung ein einziger Extraktionsschritt ausreichend sein sollte, mußte ein wesentlich höherer pH-Wert gewählt werden. Während mit Äthylendichlorid bei pH 9,0 Resochin vollständig aus Wasser wiedergefunden wird, sind es mit n-Heptan nur 70 %⁹⁾. Mit n-Hexan/Essigsäure-iso-amylester (9 + 1) konnte mit der späteren Bestimmungsmethode bei einem pH-Wert von 10,2 Resochin wieder völlig extrahiert werden.

Wurde mit Natronlauge das Blut auf einen pH-Wert von etwa 10 gebracht, so änderte sich dessen Farbe nach grünbraun, und es entstand beim Schütteln mit organischer Phase die bereits erwähnte, stabile Emulsion, von der nach dem Zentrifugieren noch ein gelartiges, leicht grün gefärbtes Gerüst in der organischen Phase zurückblieb. Wurde noch stärker alkalisch gemacht, so denaturierte das Blut und verklumpte teilweise zu gallertartiger Masse. Eine von Bruce¹⁴⁾ angewendete Methode, bei der 5 ml Blut unter Rühren mit 0,5 ml 10 n Kalilauge alkalisiert werden und anschließend die entstehende Emulsion im kochenden Wasserbad gebrochen wird, konnte nicht in Erwägung gezogen werden, da die zu untersuchenden Substanzen im heißen, alkalischen Milieu zu empfindlich sind. Das vorsichtige Überschieben der organischen mit der wäßrigen Phase, um eine Bildung von Luftblasen in der Grenzfläche zwischen beiden Phasen zu verhindern, wie es von Brodie⁹⁾ bei der Extraktion von Plasma angewandt wurde, brachte bei Vollblut keinen Erfolg.

Bei der Extraktion von hämolysiertem und zentrifugiertem Oxalatblut verwendete Münch⁸⁰⁾ eine Boratpuffer-Lösung vom pH 9,3. Die

Abbildung 4:

Titration von Blut mit Alkalisierungslösung und
1,5-proz. Kalilauge am Titrigraphen.



- Titration von 4,5 ml Heparinblut (= 3 ml Blut) mit
Alkalisierungslösung (40 % Benzyltrimethylammonium -
chlorid in 1,5-proz. Natronlauge).
- Titration von 4,5 ml Heparinblut (= 3 ml Blut) mit
1,5-proz. Kalilauge.
- . - . - . Titration von 3 ml Heparinblut (= 1,9 ml Blut) und
3 ml n-Hexan/Essigsäure-iso-amylester (9 + 1) mit
Alkalisierungslösung.

maximal extrahierbare Menge Blut betrug 0,5 ml pro 2 ml Pufferlösung. Der ursprüngliche pH-Wert erniedrigte sich dabei auf 8,85. Auf größere Mengen Vollblut war dieses Verfahren nicht übertragbar, da sich die Pufferkapazität zu schnell erschöpfte.

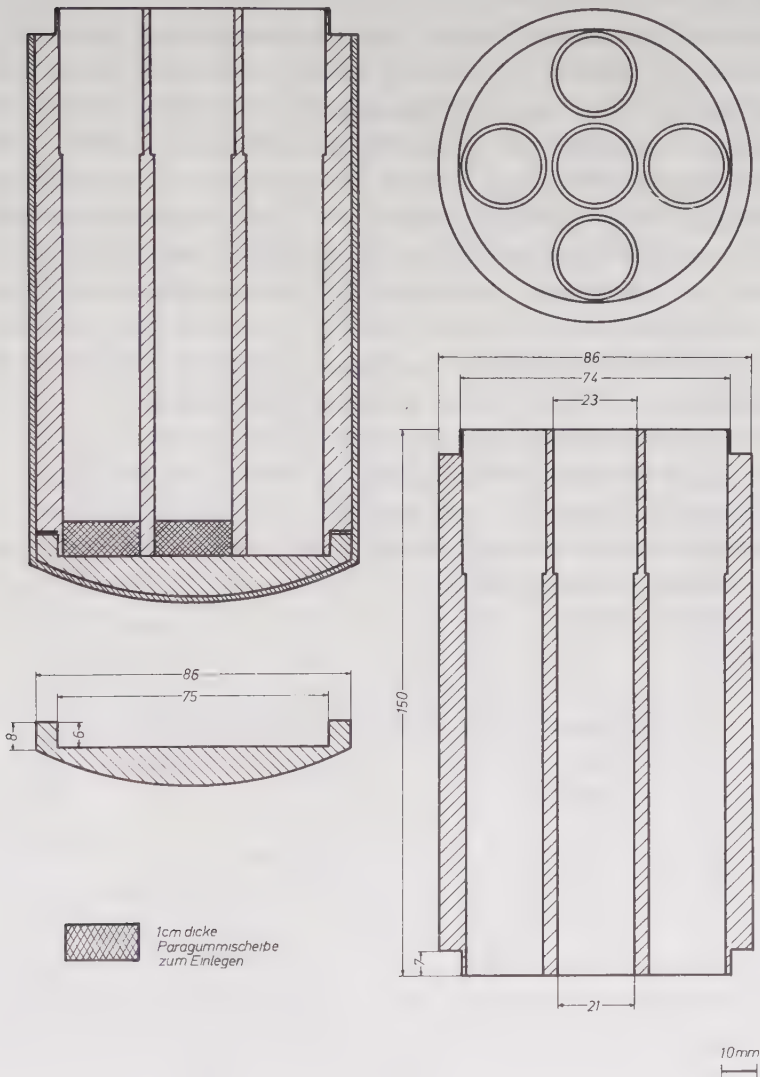
Bei der Suche nach einem geeigneten Alkalisierungsmittel, das die bei höheren pH-Werten auftretenden Koagulationen des hämolysierten Blutes verhindern konnte, stieß man auf Triton B, eine 40-proz. methanolische Lösung von Benzyltrimethylammoniumhydroxid. Nachdem das anfänglich verwendete Triton B eine Verbesserung erbracht hatte, konnte in einer 40-proz. Benzyltrimethylammoniumchlorid-Lösung mit einem Gehalt an 1,5 % Natronlauge ein für Vollblut geeignetes Alkalisierungsmittel gefunden werden. Aus den in Abb. 4 gezeigten Kurven geht hervor, daß bei gleicher Zugabe zum Blut mit Alkalisierungslösung ein höherer pH-Wert erreicht wurde als mit 1,5-proz. Kalilauge und daß die Veränderung des Blutes erst ab einem pH-Wert von etwa 10,5 eintrat. Gibt man zu je 1 ml Blut 0,3 ml dieser, an Benzyltrimethylammoniumchlorid gesättigten Lösung, so läßt sich ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen auf einer Schüttelmaschine das Blut mit dem organischen Lösungsmittel extrahieren. Es bildet sich eine leicht fließende Emulsion, die sich anschließend teilweise von selbst zu trennen beginnt. Nach kurzem, kräftigem Zentrifugieren wurde eine scharfe Trennung der beiden Phasen erreicht. Das Blut hatte seine Farbe vertieft, aber seine Beschaffenheit nicht wesentlich verändert. Der pH-Wert betrug nach der Extraktion 10,2.

Mit dem reinen Laugenanteil oder mit der äquivalenten Menge Benzyltrimethylammoniumhydroxid allein war die saubere Trennung der beiden Phasen nicht zu erreichen. Eine Erklärung für diese besondere Eigenschaft der Alkalisierungslösung bietet sich durch die Tenseideigenschaft des Benzyltrimethylammoniumions an.

Die Extraktion und die anschließende Trennung der Phasen durch Zentrifugieren erfolgte in dickwandigen Reagenzgläsern mit eingeschliffenen Stopfen.

Abbildung 5:

Einsatz für einen Zentrifugenbecher zum Zentrifugieren
der Anreicherungs- und Schüttelgläser.



Für die 1 l Becher der Zentrifuge wurden deshalb die in Abb. 5 gezeigten Einsätze gebaut. Sie waren so ausgelegt, daß sie auch für die anschließend notwendigen Anreicherungsgläser benutzt werden konnten. Für eine schnelle und leichte Handhabung war es wünschenswert, das Volumen der wäßrigen und organischen Phase möglichst klein zu halten. Beim Heparinblut erwies sich eine Verdünnung bei der Blutgewinnung durch 1 Teil vorgelegte Heparinlösung auf 2 Teile Blut am günstigsten. Dieses Heparinblut wurde nach Zugabe von zusammen etwa 0,5 ml Alkalisierungslösung und wäßriger Lösung des Standards mit Hexan/Essigsäure-iso-amylester, 9 + 1, geschüttelt, wobei das Volumen der organischen Phase bis auf ein Verhältnis von 1 : 1 zur Blutmenge reduziert werden konnte. Zum möglichst vollständigen Extrahieren genügte es, die alkalisierten Ansätze 25 Minuten lang auf einer Maschine mit kreisender Bewegung zu schütteln. Versuche mit unterschiedlicher Schütteldauer zwischen 60 und 20 Minuten zeigten keine Unterschiede in der Wiederfindung. Für den Schüttelvorgang wurden die Gläser in die Bohrungen eines Holzprismas gesteckt, in dem die mit einer Schaumstoffdecke überschichteten Stopfen durch eine Gummilasche fest angepreßt wurden.

3.2. Nachweis mit dem ^{63}Ni Elektroneneinfang-Detektor (ECD)

3.2.1. Acylierung

Für den gas-chromatographischen Nachweis standen zwei Detektoren zur Verfügung, ein ^{63}Ni Elektroneneinfang-Detektor (ECD) und ein stickstoffselektiver Flammenionisations-Detektor (NsFID). Mit dem ECD können nur Substanzen nachgewiesen werden, die eine besondere Elektroneneinfang-Eigenschaft besitzen, das sind polare, ungesättigte und halogenhaltige Verbindungen. Die Einführung von Halogen-Substituenten erhöht be-

sonders stark die Elektroneneinfang-Eigenschaft der Verbindungen. Amine werden deshalb allgemein für den Nachweis im ECD in Acyl-Derivate überführt. Man nimmt an, daß das Carbonyl-Kohlenstoffatom in der Acylgruppe am stärksten Elektronen einfängt⁶⁸⁾ und durch C-Atome, die Halogene tragen, noch zusätzliche Einfangeigenschaften hinzukommen¹⁹⁾. Es wurde deshalb das Trifluoressigsäure (TFA) - und das Heptafluorbuttersäure (HFB) - Derivat der Verbindung VII (Tab. 1) mit Hilfe der Anhydride hergestellt. Während sich das TFA-Derivat ohne weiteres bildete, mußte für das HFB-Derivat Trimethylamin als Katalysator verwendet werden¹¹⁸⁾. Die Retentionszeit auf einer 130 cm langen Trennsäule mit 1 % Versamid 900 auf Chromosorb W/AW-DMCS, 60-80 mesh und 130 ml Argon + 5 % Methan als Trägergas wurde für das TFA-Derivat mit $t_S = 1,2$ Min. und für das HFB-Derivat mit $t_S = 0,6$ Min. ermittelt. Die Bestimmungsgrenze, von Currie²¹⁾ als die 10-fache Standardabweichung des mittleren Rauschens definiert (= 5-fache Breite des Rauschbandes), wurde bei diesen beiden Derivaten von VII um 400 pg gefunden. Sie lag damit schlechter als erwartet, da sich TFA- bzw. HFB-Derivate von Aminen häufig im pg-Bereich nachweisen lassen¹¹⁸⁾. Eine mögliche Erklärung für die hohe Bestimmungsgrenze mag in der Tatsache liegen, daß Methoxygruppen im aromatischen Kern eines Amins die Empfindlichkeit im ECD wesentlich erniedrigen, und daß es sich bei der Verbindung VII um ein 4.5.8-Tri-methoxy-chinolin handelt. Durch die relativ geringe Empfindlichkeit der TFA- HFB - Derivate war eine Bestimmung ohne besondere Anreicherung nicht bis in den gewünschten Konzentrationsbereich von 0,5 - 1,0 ng/ml möglich.

3. 2. 2. Bromierungen

Da jedoch bei der Halogenierung von Substanzen die Empfindlichkeit in der Reihe $F < Cl < Br < J$ zunimmt⁵⁷⁾, war es naheliegend, die Möglichkeit einer Bromierung zu untersuchen, wobei es wünschenswert war,

nur ein oder zwei definierte Bromierungsprodukte zu erhalten. Da die zu bestimmenden Aminochinoline nicht völlig substituiert sind, bot sich die Dibromisocyanursäure (DBI) ⁴⁴⁾ an, die ein ungewöhnliches Bromierungsvermögen für aromatische Verbindungen besitzt, das selektiv auf den Kern gerichtet ist und sich bei hohen Ausbeuten durch eine äußerst kurze Reaktionszeit auszeichnet ⁴⁵⁾.

Mit der von G o t t a r d i ⁴⁶⁾ angegebenen Arbeitsweise entstanden bei der Bromierung der Verbindung VII mit DBI in 15-proz. Oleum zwei Bromierungsprodukte, bei der Verbindung VI ein Bromierungsprodukt. Im Kalottenmodell läßt sich wegen der nicht ungehindert drehbaren Methylgruppe keine 3-Brom-Verbindung von VI konstruieren. Diese wurden mit Hilfe der Säulen- und präparativen Schicht-Chromatographie rein gewonnen.

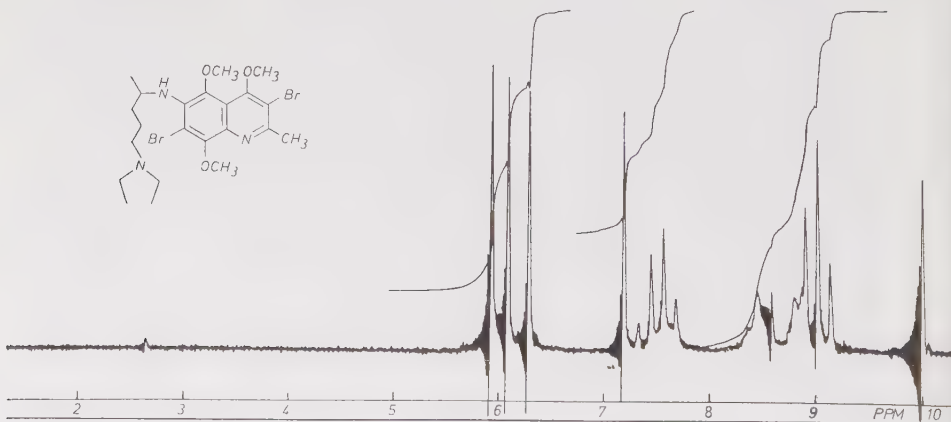
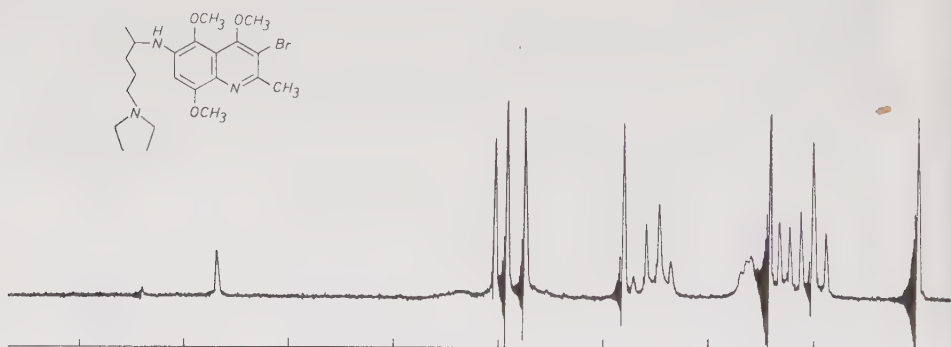
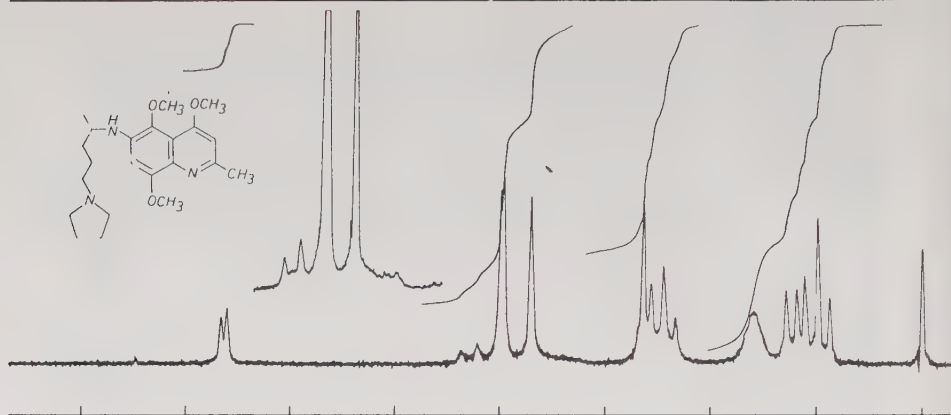
Im Massenspektrum zeigen die beiden Bromverbindungen von VII das Molek⁺ülion (M^+) als Dublett für die beiden Isotopen ⁷⁹Br und ⁸¹Br, im einen Fall bei m/e 467/469 und im anderen Fall bei m/e 545/549. Es handelt sich deshalb um die Mono- bzw. Dibromverbindung.

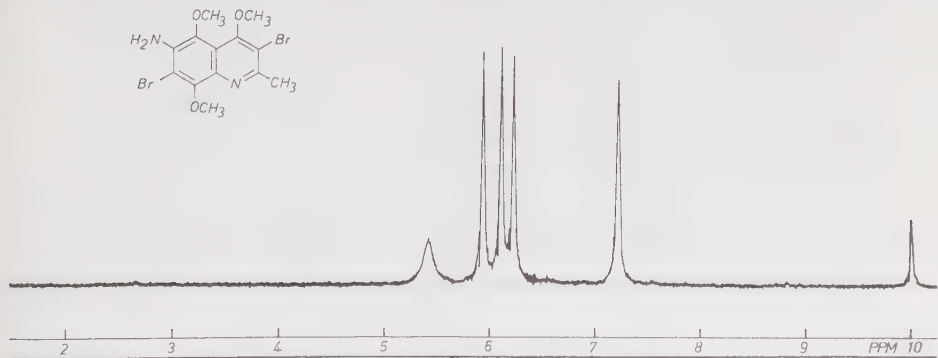
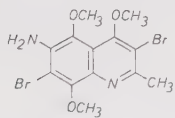
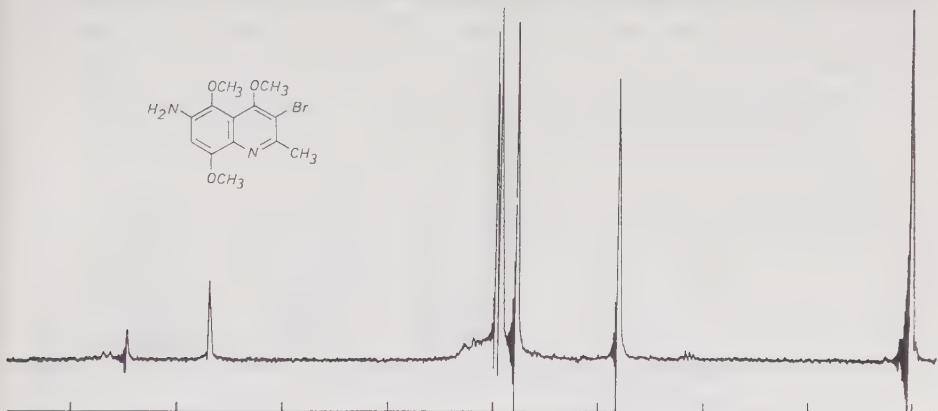
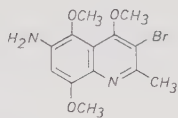
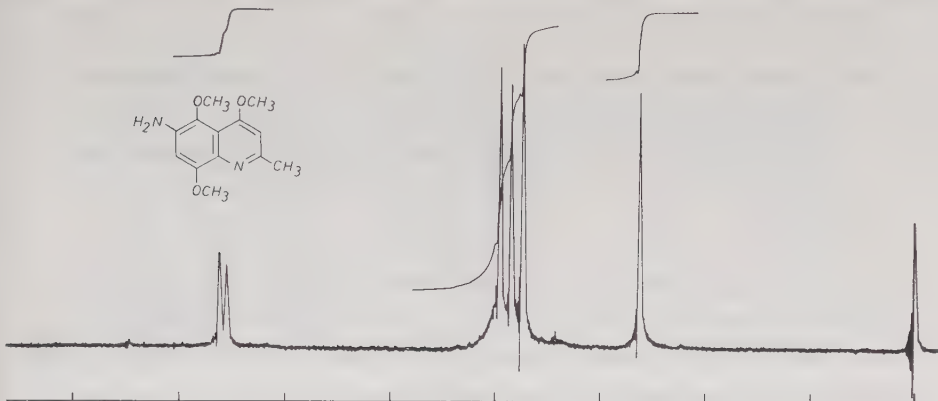
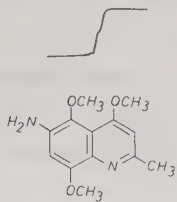
Die NMR-Spektren (Abb. 6) der Verbindungen VI und VII und ihrer Bromverbindungen wurden mit den Spektren der entsprechenden nicht basisch alkylierten Verbindungen verglichen. Mit Hilfe der bromierten und nicht bromierten Vergleichssubstanzen wurden den einzelnen Substituenten der Verbindungen VI und VII ihre Protonenresonanz-Signale zugeordnet und deren τ -Werte ermittelt. Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, daß eine Bromierung in 3-Stellung das Singulett der Protonen der Methylgruppe in 2-Stellung zu tieferem Feld verschiebt und das Signal des ursprünglichen Protons in 3-Stellung verschwindet. Bei Bromierung in 3- und 7-Stellung wurde das Singulett der Protonen der Methoxygruppe in 8-Stellung zusätzlich zu tieferem Feld verschoben. Bei den Bromierungsprodukten der Verbindung VII waren die gleichen Verschiebungen zu sehen. Sie konnten deshalb als 3-Monobrom- bzw. als 3,7-Dibrom-Substitutionsprodukte erkannt werden. Beim Bromierungsprodukt der Verbindung VI konnte in ent-

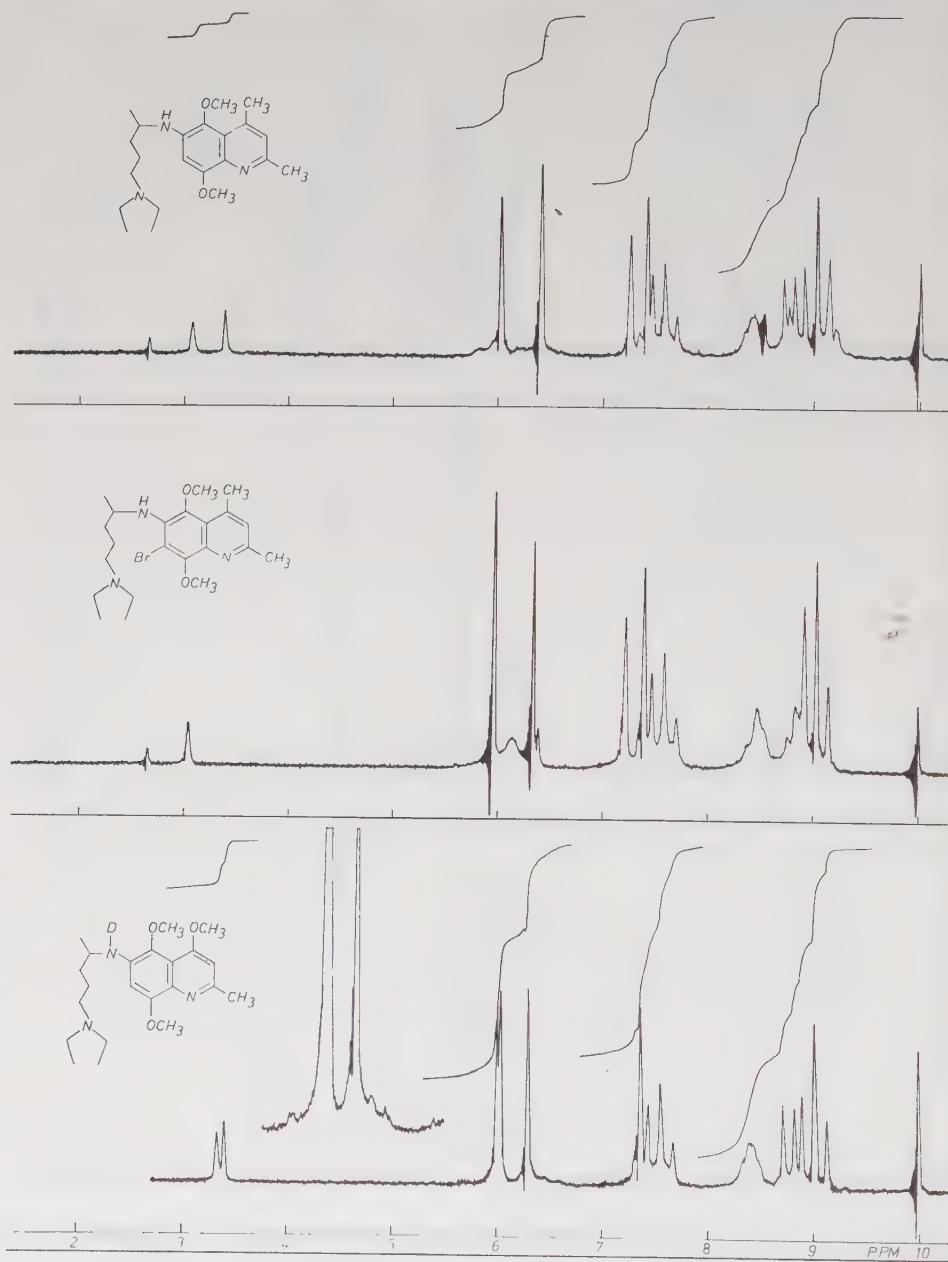
Tabelle 6:

τ - Werte der Protonenresonanz-Signale in den NMR-Spektren							
CH_3		OCH_3			H		Substituent
2	-	4	5	8	3	7	- Stellung
7,36		6,04	6,30	6,02	3,40	3,34	
7,22		6,11	6,29	6,00	-	3,34	
7,20		6,10	6,30	5,95	-	-	
7,22		6,11	6,23	5,95	-	-	
7,39		6,17	6,28	6,06	3,38	3,45	
7,21		6,10	6,25	6,05	-	3,32	
2	4	-	5	8	3	7	
7,42	7,25		6,02	6,41	3,07	3,38	
7,42	7,25		5,99	6,37	-	-	

Abbildung 6 a







sprechender Weise das Bromatom der 7-Stellung zugeordnet werden, da die beiden Singulett der Protonen der Methyl-gruppen in 2- und 4-Stellung nicht verschoben wurden, dagegen jedoch das Singulett der Protonen der Methoxy-gruppe in 8-Stellung.

Das gas-chromatographische Verhalten der Bromierungsprodukte der Verbindung VII, 3-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin (XVI) und 3.7-Dibrom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin (XV) sowie desjenigen der Verbindung VI 7-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (XIV) wurde auf verschiedenen Trennsäulen untersucht. Auf einer Versamid 900 Trennsäule wurde die niederste Bestimmungsgrenze gefunden. Die gas-chromatographischen Bedingungen, die Retentionszeiten t_S und die Bestimmungsgrenzen sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Die hohe Nachweisempfindlichkeit der Bromderivate XIV, XV, XVI sollte eine Bestimmung ohne besondere Anreicherung auch im untersten geforderten Konzentrationsbereich von 0,5 - 1,0 ng/ml Vollblut erlauben. Bei der Bestimmung der basisch alkylierten Aminochinoline aus biologischem Material wirkten sich jedoch die mitextrahierten Fremdstoffe so stark aus, daß eine einheitliche Derivatisierung und reproduzierbare Bestimmung bei Substanzmengen ab 1000 - 500 ng nicht mehr möglich war. Gegenüber dem zweiten noch in Betracht gezogenen Detektor, einem stickstoffselektiven Detektor (NsFID), dessen Nachweisgrenze bei reinen Lösungen sogar um mindestens eine Zehnerpotenz höher liegt, weist der ECD einige Nachteile auf: Bei der Bestimmung aus biologischem Material treten durch mitextrahierte Fremdstoffe große Lösungsmittelpeaks mit starkem Tailing auf, die nur langsam zur Grundlinie zurückkehren; bei nicht besonders gereinigten biologischen Extrakten kann sogar nach wenigen Einspritzungen eine Regenerierung der Trennsäule^{119, 15)} durch Ausheizen über der Arbeitstemperatur notwendig werden; die starke Abhängigkeit von der Bildung ge-

Tabelle 7 :

Gas-Chromatographie der Bromverbindungen XIV, XV und XVI auf zwei verschiedenen Trennsäulen mit dem ^{63}Ni ECD

Brom- verbindungen	Retentionszeit t_s		Bestimmungsgrenze	
	Trennsäule		Trennsäule	
	A	B	A	B
XV	1,5 Min	4,7 Min.	30 pg	150 pg
XVI	1,8 Min.	7,4 Min.	150 pg	
XIV	0,75 Min.	2,3 Min.	30 pg	100 pg

GC-Parameter:

Trennsäule A : Glas, 130 cm lang, 3 mm I.D., mit 1 % Versamid 900 auf Chromosorb W (AW-DMCS), 60-80 mesh; Säulentemperatur: 240° ; Einspritzblocktemperatur: 270° ; Detektortemperatur: 280° ; Trägergas: 170 ml/Min. Argon mit 5 % Methan; Spülgas: 30 ml/Min. Argon mit 5 % Methan; Detektor: ^{63}Ni ECD mit Pulsintervall 150 μsec .

Trennsäule B : Glas, 180 cm lang, 3 mm I.D., mit 1 % Polyvinylpyrrolidon ⁵²⁾ und 1 % Neopentylglycolsuccinat ⁵²⁾ auf Chromosorb W (AW), 80-100 mesh; Säulentemperatur: 214° ; Einspritzblocktemperatur: 257° ; Detektortemperatur: 272° ; Trägergas: 130 ml/Min. Argon mit 5 % Methan; Kein Spülgas; Detektor: ^{63}Ni ECD mit Pulsintervall 150 μsec .

eigneter Derivate im Nanogramm-Bereich, deren optimale Bedingungen für jede Substanz zu ermitteln sind, die sehr starke Beeinflussung durch Spuren von Acylierungsgemisch und seine Empfindlichkeit gegenüber Wasser schränken seine allgemeine Anwendbarkeit für die quantitative Bestimmung im biologischen Material stark ein; für die volle Ausnutzung der hohen Empfindlichkeit ist außerdem die vollständige Entfernung des Acylierungsreagenzes und der sich bildenden Säure entscheidend; bei Heptafluorbuttersäureanhydrid (Fp 107°) und Heptafluorbuttersäure (Fp 121°) gelingt dies durch Eindampfen nur unvollständig, bei der wäßrigen Extraktion der organischen Lösung dagegen kann die Stabilität der Derivate beeinträchtigt werden. Diese Schwierigkeiten entfallen bei Verwendung des NsFID, da die nicht derivatisierten Verbindungen nachgewiesen werden. Bei geeigneter Anreicherung sollte es durch seine hohe selektive Empfindlichkeit für Stickstoff, die sich im Bereich zwischen $1 : 10^3$ und $1 : 10^4$ einstellen läßt, zudem möglich sein, die Nachweisgrenze des ECD im biologischen Material ohne die hierbei notwendige, umfangreiche und aufwendige Probenvorbereitung zu erreichen.

3.3. Nachweis mit dem stickstoffselektiven Detektor (NsFID)

Während der ECD seit etwa 10 Jahren zur Verfügung steht, handelt es sich beim NsFID um die neue Variante eines thermionischen Detektors. Die Entwicklung dieser Detektorenart geht auf die Beobachtung zurück, daß Alkalisalz in einer Wasserstofflamme den Ionisationsstrom eines chlorierten Pestizids um den Faktor 100 vergrößerte ⁶⁴⁾. K a r m e n und G i u f f r i d a ^{64, 63)} beschrieben 1964 den ersten thermionischen Flammendetektor, bei dem sich ein mit Alkalisalz imprägniertes Platinnetz über der Flamme eines normalen FID befindet. In einem zweiten darüber angeordneten FID kann nur ein Signal empfangen werden, wenn das Träger-

gas halogen- oder phosphorhaltige Verbindungen mit sich führt, deren Verbrennungsprodukte die Alkaliemission vom Platinnetz vergrößern und meßbare Ionen entstehen lassen. Die in der Folgezeit entstandenen, unterschiedlich gebauten thermionischen Detektoren arbeiten nach diesem Prinzip. Sie können für alle Atome spezifisch sein, die sich mit der Lassaigne-Probe nachweisen lassen, d. h. durch Glühen mit Natrium aus organischen Verbindungen abgelöst werden. Die Funktionsweise konnte bisher nicht geklärt werden, doch von den verschiedenen Einzelbeobachtungen gilt eine relativ niedere Flammentemperatur von etwa 1600° , ein Überschuß an Wasserstoff in der Reaktionszone und eine große Oberfläche des Plasmas der Flamme ⁸⁶⁾ als wesentlich. Nach den Untersuchungen von Hartmann ⁴⁹⁾ ergibt Cäsiumbromid den empfindlichsten Phosphornachweis und nach Aue und Mitarbeitern eignet sich Rubidiumsulfat besonders für den Nachweis von stickstoffhaltigen Verbindungen ²⁾. Das Fehlen eines für Routineanalysen geeigneten, käuflichen NsFID verhinderte bisher die Verwendung dieses Detektors bei der Analyse von Arzneimitteln. Seit 1970 ist der für diese Arbeit verwendete NsFID von der Firma Hewlett-Packard, Böblingen, erhältlich. Inzwischen wurde über seine Verwendung beim Nachweis von stickstoffhaltigen Pharmaka in wäßrigen Lösungen und Urin ^{24, 25)} sowie bei der Bestimmung von Aminosäuren aus Fleisch ⁸⁾ berichtet.

Bei dem zur Verfügung stehenden NsFID wird mit der durch eine Spindelschraube verstellbaren Platin-Kollektorelektrode ein Rubidiumbromideinkristall in der Flammenzone justiert, die gleichzeitig der höchsten Stickstoffempfindlichkeit und Selektivität entspricht. Durch geringe Änderung des nur wenige Millimeter betragenden Abstandes der Salzoberfläche zur Brennerdüse kann in gewissen Grenzen die Selektivität ohne wesentlichen Empfindlichkeitsverlust verändert werden. Die Empfindlichkeit wird dabei vor allem von der Anschmelztemperatur des Rubidiumbromids bestimmt ¹⁰⁹⁾, die wiederum von der Wasserstoff- und Heliumzufuhr und der Temperatur des Detektors abhängt. Die Anzeige des NsFID erfolgt unabhängig von der

Struktur des Moleküls, dem Oxydationszustand des Stickstoffs linear und proportional dem Stickstoff-Äquivalent im Molekül. Für Methamphetamin, Heptaminol, Ephedrin, Nikethamid und Pentamethylentetrazol wird ein linearer Bereich von .20 pg - 200 ng pro Injektion angegeben ²⁵⁾. Für Azobenzol wurde im Firmenprospekt meines NsFID ein linearer Bereich von 0,6 pg N/sec bis 170 ng N/sec angegeben.

3.3.1. Entwicklung eines Anreicherungsverfahrens für den NsFID

3.3.1.1. Untersuchte Anreicherungsmöglichkeiten

Der geringste noch zu analysierende Blutspiegel sollte etwa 0,5 - 1 ng/ml betragen. Für eine gas-chromatographische Bestimmung mußte deshalb eine Anreicherung um den Faktor 300-500, d.h. von 8 ml Heparinblut in 25 - 15 µl organisches Lösungsmittel, erfolgen. Das allgemein übliche Verfahren für Amine besteht in der Rückextraktion in die wäßrige Phase zur gleichzeitigen Reinigung des biologischen Extraktes ^{23, 22, 14)} und in der anschließenden Ausschüttelung mit einem organischen Lösungsmittel. Der einfachste Weg zu einer Anreicherung dieser gereinigten organischen Phase besteht im vorsichtigen Einengen zur Trockne und in der Wiederaufnahme des Rückstandes in einem kleinen Volumen Lösungsmittel ^{36, 15)}. Bei dieser Arbeitsweise traten bei den vorliegenden öligen Aminochinolinen in orientierenden Versuchen Verluste von 50-100 % in der Wiederfindung auf.

Ein zweiter, schwierigerer Weg besteht darin, die wäßrige Phase nur mit einem kleinen Volumen von 50-100 µl an organischem Lösungsmittel auszusütteln. Die wäßrige Phase wird mit einer Kapillare abgesaugt und die verbliebene organische Phase im spitzen Boden eines Reagenzglases gesammelt ^{22, 23)}. Dies ist durch die Verteilungskoeffizienten und die da-

mit verbundenen Mindestmengen an Lösungsmittel in seinem Anreicherungs-
effekt beschränkt. Eine dritte Arbeitsweise besteht darin, die organische
Phase im Spitzbodenglas mit einem Stickstoffstrom auf ein kleines Volumen
einzuziehen^{119, 16)}. Wurde jedoch auf 50-100 µl eingeengt, so war in den
eigenen Versuchen kein ausreichender Rückspüleffekt an der Glaswandung
mehr vorhanden und die Substanz ging zu einem großen Teil dem Nachweis
durch Adsorption am Glas verloren. Von K a z y a k⁶⁶⁾ wurde eine Ap-
paratur zum Einengen von leicht flüchtigen Lösungsmitteln beschrieben,
mit der beispielsweise 50 ml einer Lösung mit 40 ng/ml des kristallisier-
baren Chinin ohne Verlust fast zur Trockne eingeengt werden konnten. Die
Apparatur besteht im Prinzip aus einer regelbaren Heizquelle in Form eines
Heizbandes, die das Gefäß in der Nähe der Oberfläche heizt; ein Rohr, das
in das Gefäß bis knapp an die Oberfläche der Flüssigkeit reicht, ist an eine
Vakuumpumpe angeschlossen; die Lösungsmitteldämpfe werden in dem
Maße, in dem sie sich bilden, abgesaugt, um das Verdampfen der Flüssig-
keit zu beschleunigen; ein Motor bewegt die Gläser mit konstanter Geschwin-
digkeit aufwärts, um die Flüssigkeitsoberfläche immer in der geheizten Zone
zu halten; durch gelegentliches Anheben des Rohres wird die Glaswandung
durch den kondensierenden Dampf gespült; die durchschnittliche Abdampf-
leistung wird am Siedepunkt des Lösungsmittels mit 1 ml/Min. angegeben.
Mit einer nachgebauten Apparatur wurden die organischen Phasen bei der
Extraktion der Aminochinoline aus biologischem Material für die Gas-
Chromatographie eingeengt. Es konnte jedoch nicht die gewünschte Anrei-
cherung erzielt werden, da ab einem Volumen von etwa 100-200 µl der
Rückspüleffekt für die vorliegenden öligen Aminochinoline nicht mehr aus-
reichte und dadurch große Verluste an der Glaswandung auftraten. Auch
nach Verwendung besonderer Gläser mit unten angesetzter Kapillare und
nach verschiedenen Verbesserungen an der Heizung konnten Lösungen mit
weniger als 500 ng 6-Aminochinolin nicht unter 100 µl eingeengt werden.
Es wurde darauf verzichtet, mit einem inneren Standard diese Arbeitsweise
weiter zu verfolgen.

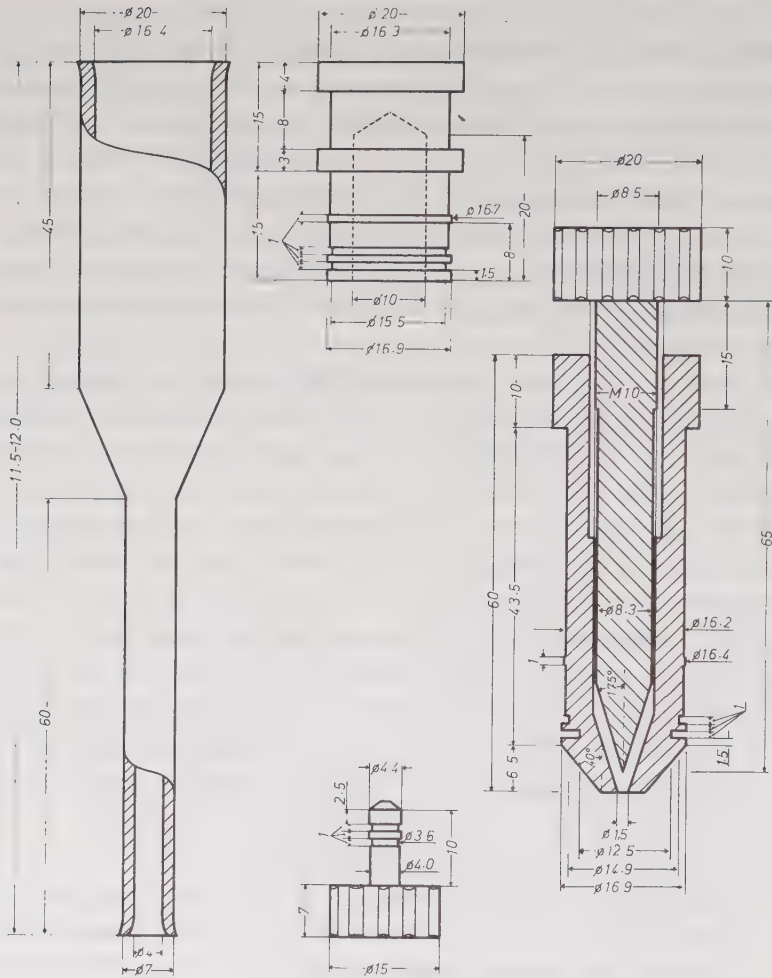
3.3.1.2. Anreicherungsgläser

Adsorptionsverluste an der Glaswandung stellen bei der Analyse von Aminen das größte Problem dar. Das Ausmaß der Adsorption hängt dabei von der Art der Substanz und des Lösungsmittels ab, wobei polare Moleküle in unpolaren Lösungsmitteln am stärksten adsorbiert werden ^{12, 119)}. Zur Beseitigung dieser Schwierigkeit wurde entweder die Polarität des Lösungsmittels durch Zugabe eines Alkohols ¹²⁾ erhöht oder durch Silanisierung die der Glasoberfläche vermindert ¹¹⁹⁾ bzw. durch Verwendung von Polycarbonat-Gefäßen ²²⁾ beseitigt. W a l l e ¹¹⁹⁾ konnte zeigen, daß aus einer Lösung von 20 ng Phenmetrazin in 200 ml Benzol bei äthanolgespülten Gläsern nur noch 50 % wiedergefunden werden; bei Gläsern, die einige Tage der Laborluft ausgesetzt waren, erniedrigt sich die Wiederfindung sogar auf 20 %; die Hauptmenge wird bereits während der ersten 30 Minuten adsorbiert, bis sich dann nach 10 Stunden ein Gleichgewicht einstellt; bei Zugabe von etwa 0,5 % Isobutylalkohol bzw. Trimethylamin wird jedoch die Adsorption vollständig verhindert; bei Silanisierung betrug die Wiederfindung beim gleichen Versuch 90 %; keine Verluste dagegen wurden beobachtet, wenn das Glas eine wäßrige Phase enthielt; bei Pipetten genügten wenige Sekunden Kontakt der Lösung mit der Glasoberfläche für Adsorptionsverluste von 20 %; man unterdrückte diesen Effekt, indem man die Pipetten silanisierte ¹¹⁹⁾ oder kurz vor Gebrauch mit Isoamylalkohol benetzte. C u r r y ²²⁾ verwendete sogar Pipetten aus Polycarbonat.

Bei der Entwicklung eines geeigneten Anreicherungsverfahrens für den NsFID mußte von mir ein Weg gefunden werden, der ohne Eindampfen der org. Phase zu einer Anreicherung führte. Die Ausschüttelung des ursprünglichen biologischen Extraktes mit einem kleinen Volumen Säure und die Rückextraktion in das endgültige Volumen organischen Lösungsmittels erschien als der geeignetste Weg, da durch die Gegenwart einer wäßrigen Phase die Adsorptionsverluste vermieden werden können. Voraussetzung

Abbildung 7:

Anreicherungs-glas mit Teflonkolben und -stopfen nach
Kap. 3.3.1.2.



dafür waren jedoch geeignete Gläser, in denen 25 µl organische Phase wieder so gesammelt werden konnten, daß noch Proben für die Gas-Chromatographie zu entnehmen waren. Gläser mit eingeschliffenem Stopfen von derart kleinem Lumen waren jedoch ungeeignet, da zur vollständigen Extraktion im Ultraschallbad geschüttelt werden mußte und dabei zu große Verluste an organischer Phase an den Schlißflächen auftreten konnten. Zudem war die Handhabung und Reinigung derartig kleiner, einseitig offener Gefäße schwierig. Mit den in Abb. 7 gezeigten Anreicherungsgläsern und Teflonstopfen⁺⁾ gelang mir schließlich eine gewünschte Anreicherung aus 8 ml biologischem Extrakt über einen Zwischenschritt im gleichen Gefäß in mindestens 15 µl organische Phase.

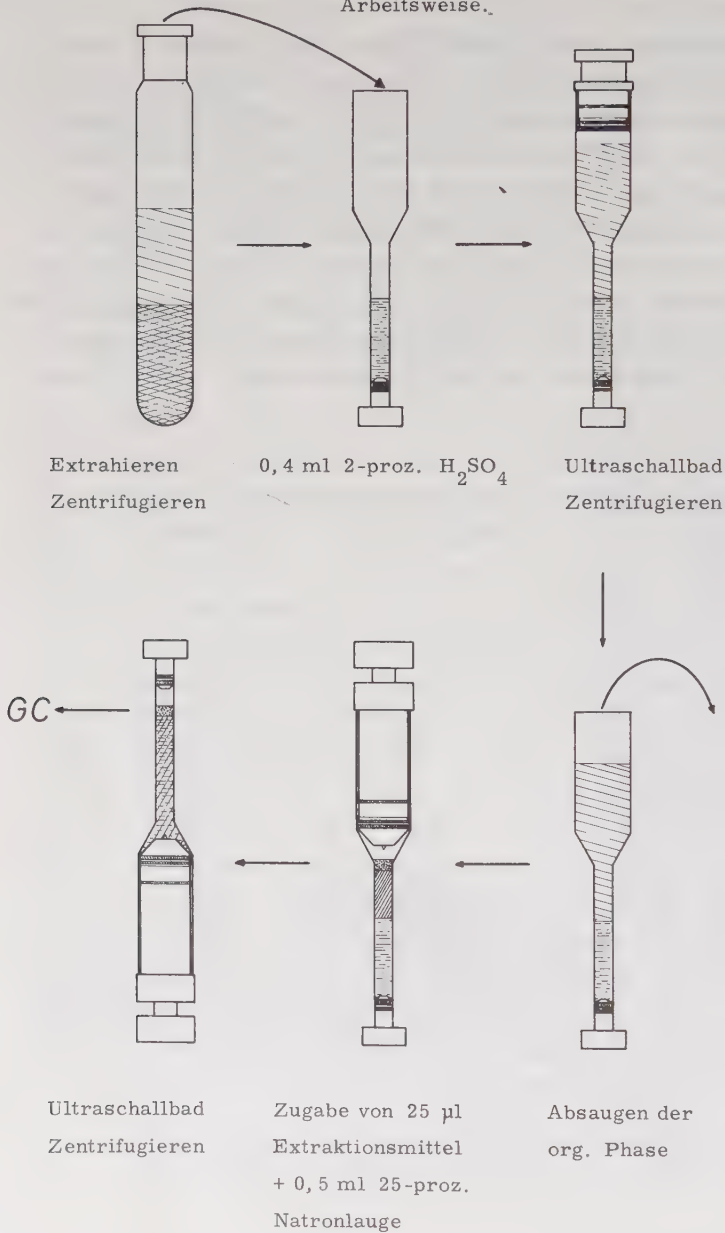
Die Anreicherung der Aminochinoline aus Blutproben erfolgte nach dem in Abb. 8 dargestellten Schema. Die alkalisierten Proben wurden in den Schüttelgläsern mit 8 ml n-Hexan/Essigsäure-iso-amylester, 9 + 1, extrahiert und zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgehoben und in den Anreicherungsgläsern mit 0,4 ml 2-proz. Schwefelsäure im Ultraschallbad ausgeschüttelt. In den in Abb. 5 gezeigten Einsätzen zentrifugierte man anschließend die Schwefelsäure in den Hals der Gläser und saugte mit einer Kapillare die organische Phase ab. Nach Zusatz von 25 µl Toluol und 0,5 ml 25-proz. Natronlauge wurde wieder im Ultraschallbad geschüttelt und nun die organische Phase in den Hals der Gläser zentrifugiert.

Die bereits erwähnten Adsorptionsverluste ließen sich dadurch vermeiden, daß neben der organischen stets eine wäßrige Phase vorhanden war. Lediglich bei der Überführung in die Anreicherungsgläser kam die Base in organischem Lösungsmittel mit der Glasoberfläche alleine in Berührung. Deshalb wurden die Pipetten kurz vor Gebrauch mit der vorrätigen blut-organischen Phase von unbehandelten Tieren benetzt. Diese Arbeitsweise ersparte ein Silanisieren der Pipetten.

⁺⁾ Für die Anfertigung dieser Stopfen und der übrigen in dieser Arbeit beschriebenen Hilfsmittel danke ich den Herren der Institutswerkstatt, insbesondere Herrn W. Keller.

Abbildung 8:

Anreicherungs-schemata der in Kap. 5.4.3. beschriebenen Arbeitsweise.



Die einzelnen Schritte der Anreicherung wurden an Zusatzversuchen durch Vergleich der Peakhöhen mit einem äußeren Standard überprüft. Es wurden jeweils 400 ng Resochin zugesetzt. Aus dem organischen Extrakt von 3 ml Mäuseblut erreichte man eine Wiederfindung von 98-100 %, unabhängig davon, ob die organische Phase vorher mit Lauge gewaschen wurde oder nicht. Bei Zusatz von Resochin direkt zu 3 ml Mäuse- oder Vogelblut wurden 83-90 % der Substanz wiedergefunden. Der entsprechende Wasserwert erbrachte eine Wiederfindung von 98-100 %.

Bei der weiter unten ausgeführten Beurteilung der gesamten Methode mit innerem Standard und Integratorauswertung wurden die Korrelationskoeffizienten ⁹³⁾ von doppelt bestimmten Blutspiegelkurven berechnet und daraufhin überprüft, ob sie sich in statistisch gesichertem Ausmaß voneinander unterscheiden.

3.4. Die gas-chromatographische Apparatur

Die Nachweisgrenze einer gas-chromatographischen Bestimmungsmethode wird neben der Art der Extraktion und Anreicherung wesentlich von der gas-chromatographischen Apparatur bestimmt. Besondere Bedeutung kommt hier der Beschaffenheit der Trennsäule zu, da Adsorptionsverluste oder Zersetzung der Substanz im Nanogramm-Bereich die volle Ausnutzung der Detektorempfindlichkeit verhindern können. Es war deshalb naheliegend, für die Chromatographie der Substanzen möglichst günstige Bedingungen zu schaffen, um eine Begrenzung des Nachweises durch diesen Teil der Methode zu vermeiden. Der Auswahl des Säulen- und Trägermaterials, der Trennflüssigkeiten und nicht zuletzt der Herstellung der Trennsäulenfüllung kam deshalb besondere Bedeutung zu.

3.4.1. Herstellung der Trennsäulen

Bei der Auswahl der Trennsäule wurde von den von Holtzman⁵²⁾ beim Nachweis von Resochin aus reinen Lösungen gemachten Erfahrungen ausgegangen: Während er bei Verwendung einer Trennsäule mit 3,8 % SE-30 auf Gas-Chrom P (DMCS) nur eine Empfindlichkeit von 50 ng erreichte, erbrachte eine von ihm nach der von Van den Heuvel¹¹⁵⁾ angegebenen Vorschrift hergestellte 50 cm lange Trennsäule mit 1 % Polyvinylpyrrolidon und 1 % Neopentylglycolsuccinat auf demselben Trägermaterial bei 220° Ofentemperatur eine Nachweisgrenze von 5 ng. Eine derartige Trennsäule aber, die nur wenige Grade unter der maximalen Arbeitstemperatur betrieben werden mußte, kam für meine Routineanalysen nicht in Betracht. Mein Augenmerk richtete sich deshalb auf Silikongummi-Trennflüssigkeiten, die auch bei Säulentemperaturen über 250° betrieben werden konnten, von denen die Methylsilikongummi SE-30 und OV-1 am häufigsten bei der Analyse von Arzneimitteln verwendet werden.

Auf käuflichen Trennsäulen mit 3,8 % SE-30 auf Diatoport S, 80-100 mesh, konnten nur die unpolarsten Aminochinoline einwandfrei chromatographiert werden. Verbindungen wie VI und VII zeigten dabei starkes Tailing und eine geringe Nachweisempfindlichkeit. Erst nach längerem Dauerbetrieb mit häufigen Einspritzungen von 2,4-Pentandion³⁾ und N.O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid⁶⁹⁾ und jeweils vorheriger Sättigung mit dem zu bestimmenden Aminochinolin erfolgte mit der Zeit eine Verbesserung der Chromatogramme. Es wurde deshalb angestrebt, selbst bessere Trennsäulen herzustellen. Da eine Imprägnierung des Trägermaterials nach dem am häufigsten angewandten Verfahren, bei dem das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt wird, keine Verbesserung erbrachte, wurden in der von Kaiser⁶²⁾ beschriebenen Apparatur nach vorherigem Entlüften des Trägermaterials im Stickstoffstrom und

in der Wärme einige Trennsäulenfüllungen hergestellt. Die Ergebnisse waren zwar wesentlich besser, konnten aber bei den polaren Verbindungen ebenfalls nicht voll befriedigen. Zudem war die Apparatur nicht leicht zu handhaben und die gewünschte Wirbelung im Stickstoffstrom war nur unvollständig zu erreichen. Die Peakschärfe basischer Verbindungen durch Imprägnieren des Trägermaterials mit Kaliumhydroxid zu verbessern^{104, 16, 5, 18, 116)}, erschien für die zum Teil sehr empfindlichen Aminochinoline ungeeignet. Die weiter von Kaiser⁶²⁾ angegebene Adsorptionsimprägnierung in der Säule versprach optimale Belegung des Trägermaterials. Nach diesem Adsorptionsverfahren hatte bereits früher Smith¹⁰³⁾ Trägermaterial in der Chromatographie-Säule durch langsames Perkolieren mit dem doppelten Volumen Imprägnierlösung besonders gleichmäßig belegt. Eine derartige Arbeitsweise vermied eine inhomogene Imprägnierung oder die Bildung adsorptionsaktiver "Zentren" durch mechanische Zerkleinerung beim nachträglichen Füllen der Säule. Das hierzu notwendige Umpumpen der Imprägnierlösung in der bereits mit Trägermaterial gefüllten Säule mit Hilfe einer Schlauchpumpe scheiterte bei mir daran, daß kein geeignetes, elastisches Schlauchmaterial gegen unpolare Lösungsmittel wie Hexan oder Toluol, die für eine gute Benetzung des hydrophoben Trägers notwendig sind, beständig war. Es gelang mir schließlich, mit der in Kapitel 5.1.4.6. geschilderten Arbeitsweise eine einwandfreie Adsorptionsimprägnierung in der Säule durchzuführen, ohne Gefahr zu laufen, Fremdstoffe einzuschleppen. Für die Güte der Imprägnierung war nicht so sehr die Häufigkeit des Umpumpens entscheidend als vielmehr das sich daran anschließende, möglichst langsame Ausdrücken der Imprägnierlösung aus der Säule. Damit bei diesem Vorgang keine Anreicherung der Trennflüssigkeit am Ende der Säule durch Verdunsten eintreten konnte, wurde Toluol als Lösungsmittel dem Hexan vorgezogen. Nachdem kein Toluolgeruch mehr vorhanden war, baute man die Trennsäule in den kalten GC-Ofen und entfernte durch langsames Aufheizen Sauerstoff und restliches Lösungsmittel.

Die anschließende Konditionierung erfolgte nach der im Amerikanischen Arzneibuch ⁸⁸⁾ angegebenen Vorschrift ohne Trägergasstrom an der maximalen Arbeitstemperatur der Trennsäulen (s. Kapitel 5.1.4.7.). Die Inertheit der Trennsäulenfüllung wurde durch Einspritzen des empfindlichen Cholesterols geprüft ^{3, 88)}. Man erhielt einen symmetrischen Peak, da kein Cholesterol durch Dehydrierung verändert wurde. Mit diesem Verfahren der Adsorptionsimprägnierung war es mir möglich, Trennsäulen mit sehr guten chromatographischen Eigenschaften reproduzierbar herzustellen, mit denen sich basisch alkylierte Aminochinoline und andere basische Arzneimittel mit guter Peakform und ohne Verluste im Nano- und Picogramm-Bereich chromatographieren ließen. Diese Säulen konnten nach der Konditionierung bereits nach wenigen Einspritzungen im höchsten Empfindlichkeitsbereich verwendet werden und zeigten auch nach einjährigem Dauerbetrieb keine Veränderungen in den Chromatogrammen. Diese Art der Trennsäulenherstellung schuf mit die Voraussetzung, Aminochinoline ohne Derivatisierung im Bereich von einem Nanogramm bestimmen zu können.

Von den untersuchten Trägermaterialien Chromosorb G, Chromosorb W, Gas-Chrom Q, Diatoport S, Anakrom Q und Chromosorb W High Performance erwies sich letzteres am geeignetsten: In einem Vergleichsversuch waren zwei identische mit Anakrom Q und Chromosorb W/H.P. gefüllte Säulen hintereinandergeschaltet, gleichzeitig mit OV-1 Trennflüssigkeit imprägniert und konditioniert worden; während die Trennsäule mit Chromosorb W/H.P. nach drei Einspritzungen von je 100 ng Resochin die für diese Substanz bei den gegebenen Bedingungen optimale Peakhöhe erbrachte, konnte diese bei der Vergleichssäule erst nach einer Woche erreicht werden.

Von den zahlreichen untersuchten Trennflüssigkeiten kamen nur die Silikon-gummi und von diesen wieder OV-1, OV-101 und OV-17 wegen ihrer großen Temperaturbelastbarkeit in die engere Wahl, nachdem sich gezeigt hatte, daß Aminochinoline, die durch längere Alkylketten oder z. B. durch

eine Morpholinogruppe substituiert sind, nur noch bei hohen Säulentemperaturen über 250° chromatographiert werden können. Trennsäulen der beiden Methylsilikongummi OV-1 und OV-101 unterschieden sich praktisch nicht in ihrer Eigenschaft, mit dem flüssigen OV-101 waren aber leichter Imprägnierlösungen herzustellen. Der Phenylmethylsilikongummi OV-17 erbrachte bessere Trennleistung und schärfere Peaks. Es wurden nur silanisierte Glassäulen (s. Kapitel 5.1.4.2.) mit einem Innendurchmesser von 3 mm verwendet, deren Länge von ursprünglich 200 cm auf 150 und 100 cm verkürzt wurde, wenn es die geforderte Trennleistung erlaubte.

Für die Trennleistung und Peakschärfe erwies es sich als vorteilhaft, die durch Abrieb entstandenen feinen Anteile des Trägermaterials durch Aufschlämmen in Methanol und anschließendes Dekantieren zu entfernen.

Anfänglich wurde von mir eine geringe Belegkonzentration von 1 % bevorzugt, um die Arbeitstemperatur der Trennsäule möglichst nieder zu halten. Bei der Analyse biologischer Extrakte erwies sich aber eine Imprägnierung mit etwa 2 - 4 % am günstigsten.

Die gewünschte Belegung des Trägers mit Trennflüssigkeit in Gewichtsprozenten wurde mit der Konzentration der Imprägnierlösung geregelt, die man mit den von Mc Nair und Bonelli ⁷⁸⁾ für die einzelnen Trägermaterialien angegebenen Faktoren durch Multiplikation mit der geforderten Imprägnierung erhielt. Die Belegkonzentration war nach dieser Methode zwar nicht exakt bekannt, ließ sich aber gut reproduzieren, so daß bei entsprechenden Trennsäulen gleiche Retentionszeiten erhalten wurden. Im praktischen Gebrauch war die genaue Kenntnis auch nicht notwendig. Sie konnte im Bedarfsfall durch Auswiegen der Säule oder durch Verglühen einer Probe bestimmt werden.

3.4.2. Der stickstoffselektive Detektor

Die Empfindlichkeit des NsFID nimmt nicht nur mit der Zufuhr von Wasserstoff und Trägergas, sondern auch mit der Erhöhung der Temperatur zu. Da ich aber die höchste Empfindlichkeit erreichen wollte, mußte bei der maximalen Detektortemperatur von 420° gearbeitet werden. Dieser Temperatur waren die bis etwa 250° brauchbaren Silikongummiringe, wie sie für den Anschluß der Säulen benötigt werden, jedoch nur kurzzeitig gewachsen. Um die Säulen aber trotzdem an den 420° heißen Detektor anschließen zu können, wurde sein Eingang mit dem in Abb. 9 gezeigten Anschlußstück um 60 mm in den auf meistens 260° geheizten Ofenraum verlegt. Gleichzeitig wurde die Wasserstoffzufuhr, die bei der ursprünglichen Ausführung gegen das in den Anschluß einströmende Trägergas gerichtet ist, so zugeführt, daß ein sogenannter Nachbeschleunigungseffekt erreicht und eine Verwirbelung der am Säulenende austretenden Gasphase vermieden wurde. Das Anschlußstück wurde in der Institutswerkstatt aus V 4 A -Stahl gefertigt und im Innern hochglanzpoliert; es hatte keinen Einfluß auf die Stabilität der chromatographierten Verbindungen, ebenso wenig wie die Stahlkapillaren ⁹⁴⁾ im Detektorblock als Zuführung zur Brennerdüse, was auf die hohe Durchtrittsgeschwindigkeit zurückgeführt werden kann.

Erst durch die Verwendung dieses Detektor-Anschlußstückes war ein mehrtägiger, pausenloser Betrieb des NsFID bei Ausnutzung der vollen Empfindlichkeit, ohne Auswechseln der Silikongummiringe möglich.

Da die Heizung des Detektors nur indirekt vom Detektorblock aus erfolgte, wurde von mir später eine eigene Heizung für den Detektorraum eingebaut ⁹²⁾. In der in Abb. 10 gezeigten Weise wurden zwei 85 W Heizpatronen und ein Thermoelement in das Gehäuse des Detektorraumes eingebaut und konnten an die Temperatursteuerung des ECD angeschlossen

Abbildung 9:

Zwischenstück für den Anschluß der Trennsäulen an den stickstoffselektiven Detektor (Kap. 3.4.2.)

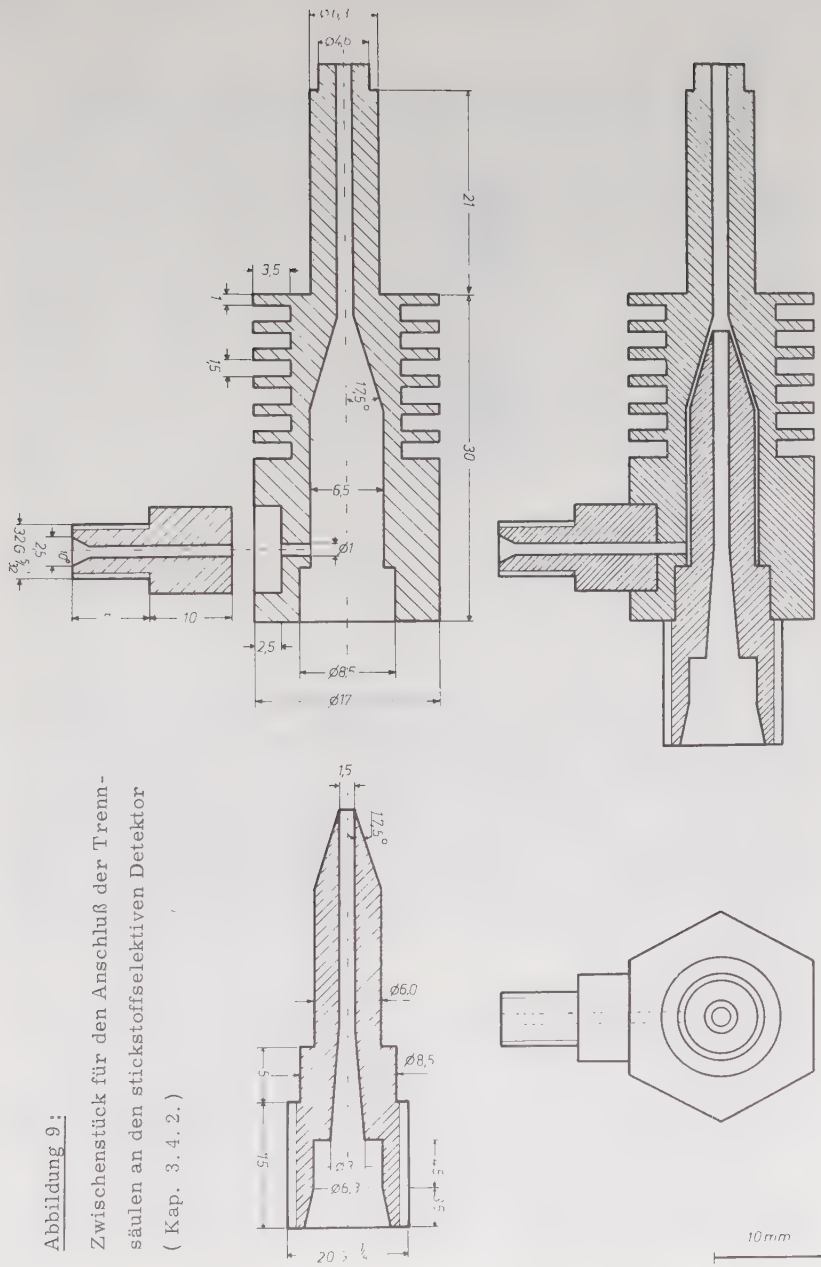
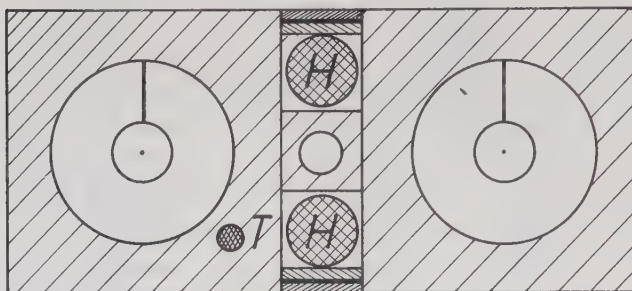


Abbildung 10:

Zusätzliche, regelbare Heizung für den Detektorraum des NsFID.



H = Heizpatronen 85 W, 120 V.

T = Thermoelement

werden, da dieser nicht gleichzeitig neben dem NsFID betrieben wurde. Durch diese eigene Detektorraumheizung war es möglich, die Empfindlichkeit, unabhängig von den sonst zur Verfügung stehenden Mitteln der Gaszufuhr zu erhöhen. Gleichzeitig konnte die Detektorblocktemperatur nach Wahl auf ein sinnvolles, die chromatographierten Substanzen schonendes Maß gesenkt werden. Bei den verschiedenen Temperaturen im Detektor und Detektorblock wurden, bei sonst gleichen Bedingungen für 100 ng Resochin folgende Peakhöhen erreicht:

Temperatur °C		Peakhöhe mm
Detektorblock	Detektor	Range $10^3 \cdot 32$
420°	240°	97 mm
300°	280°	104 mm
430°	295°	139 mm

Die ursprüngliche Ausführung des NsFID enthielt einen Rubidiumbromideinkristall mit einer 0,8 mm Bohrung in der Längsachse, die nach Gebrauchsanweisung genau über der Flammenspitze justiert werden sollte. Ein vom Applikationslaboratorium der Firma Hewlett-Packard zur Verfügung gestellter Kristall ohne Bohrung zeigte sich ebenso geeignet, ersparte aber die mühsame Justierung und besaß durch die einfachere Reinigungsmöglichkeit eine längere Lebensdauer. Beim Betrieb des Detektors überzog sich nämlich der Kristall mit einem feinen Belag von Siliziumdioxid, welches aus der Trennsäule stammte, wodurch die Selektivität und Empfindlichkeit während einiger Stunden Brenndauer vermindert wurde. Das regelmäßig notwendige Entfernen dieses Belages gelang mir am einfachsten und schonendsten mit Hilfe eines Glasfaserradierstiftes. Eine kleine Vertiefung von etwa 1 mm, die sich im Laufe der Zeit in die Salzoberfläche einbrannte, wirkte sich auf die Empfindlichkeit des Detektors günstig aus, da die gewünschte starke Deformierung der Flammenform und die Vergrößerung des Ionisationsstromes dadurch gefördert wurde. Bei einer weiteren Vertiefung des Kraters dagegen wurde die Flamme leicht bei Einspritzungen durch das Lösungsmittel gelöscht. Es wurde deshalb die Salzoberfläche durch Abradieren des Kraterandes mit dem Glasfaserstift in der beschriebenen, günstigen Form gehalten.

Um die Empfindlichkeit des Detektors gegen Zugluft zu verringern, wurde die Öffnung für den Abzug der Verbrennungsgase mit einem Metallsinterplättchen verschlossen.

Zum Abschluß der vorliegenden Arbeit wurde der bisher verwendete NsFID durch den Einbau einer gleichzeitig der Zündung dienenden, ringförmig um die Spitze der Brennerdüse führenden Hilfselektrode in seiner Empfindlichkeit verbessert. Durch Veränderung der angelegten Spannung und Absaugen der überschüssigen Rubidiumionen wird eine zusätzliche elektrische Optimierung möglich, die das Grundrauschen um den Faktor 10 verringert und das Stickstoffsignal 5-10 mal empfindlicher nachweisen läßt.

3. 5. Arbeitsweise mit innerem Standard

Die Arbeitsweise mit innerem Standard ^{69, 60)} liefert die genauesten Ergebnisse und ist bei Spurenanalysen unersetzlich. Sie erfordert zwar einigen zusätzlichen Aufwand, erlaubt es jedoch gleichzeitig, Peaks mehrerer verwandter Substanzen auszuwerten. Vor allem bleiben bei dieser Arbeitsweise Änderungen in der Empfindlichkeit des Detektors, wie sie beim NsFID bei längerer Betriebsdauer auftreten, ohne Einfluß auf das Analyseergebnis. Ebenso entfällt die bei der Arbeitsweise mit äußerem Standard auftretende große Schwierigkeit, reproduzierbare Peakflächen durch exakte Dosierung und konstante Einspritzgeschwindigkeit zu erreichen. Wird der Standard zur Analysenprobe zugesetzt, so macht er die gleichen Aufarbeitungsschritte, wie die zu bestimmende Substanz mit. Verluste irgendwelcher Art wirken sich auf beide gleich aus und es entfällt das genaue Abmessen von Aliquots. Um die Vorteile dieser Arbeitsweise nützen zu können, muß die als Standard vorgesehene Substanz aber folgende Eigenschaften besitzen ¹²⁰⁾ : Sie sollte einen möglichst ähnlichen Retentionswert wie die zu bestimmende Substanz aufweisen, aber einen vollständig getrennten Peak ergeben; sie muß unter den analytischen Bedingungen stabil sein und darf nicht mit der Probe reagieren; vor allem sollte sie in ihren funktionellen Gruppen der Analysesubstanz entsprechen, um im gesamten Bestimmungsverfahren ein möglichst ähnliches Verhalten zu zeigen. Diese Forderungen machen es schwierig, eine optimale Standardsubstanz zu finden. Das 4-Aminochinolin Resochin erwies sich bei der Bestimmung der meisten Aminochinoline als geeigneter innerer Standard. Für die Verbindungen, deren Retentionswerte sich von dem des Resochins zu wenig unterscheiden, wurde 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxychinolin, Plasmochin ^(R) -Base verwendet. Beide Verbindungen standen in Form reiner Salze zur Verfügung. Resochin ist käuflich als Diphosphat erhältlich und Plasmochin wurde in der in Kapitel 6. 8. beschriebenen

Weise hergestellt und über präparative Schicht-Chromatographie als Naphthalin-1, 5-disulfonat rein gewonnen.

Für die exakte quantitative Bestimmung mit Hilfe eines inneren Standards muß die Anzeigeempfindlichkeit jeder einzelnen Substanz relativ zum inneren Standard experimentell ermittelt werden.

Der Faktor der relativen Anzeigeempfindlichkeit

$$F_R(i) = \frac{(\text{Fläche/ng})_{\text{Standard}}}{(\text{Fläche/ng})_{\text{Substanz}}}$$

gibt die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektors für den Standard und die Substanzen wieder. Er gibt das Flächenverhältnis an, das erhalten wird, wenn gleiche Mengen an Verbindung und Standard bestimmt werden. Der nach dieser Formel erhaltene Faktor wird als Standardkorrekturfaktor ⁶¹⁾ oder substanzspezifischer Korrekturfaktor ⁶⁹⁾ bezeichnet, der sich aber nur auf reine Lösungen bezieht. Bei der Bestimmung aus biologischem Material, dem Standard und Verbindung vor der Aufarbeitung zugesetzt wurden, beinhaltet ein solcher Faktor jedoch nicht nur die unterschiedliche Anzeigeempfindlichkeit einer Substanz relativ zum Standard, sondern auch ihr unterschiedliches Verhalten bei der Extraktion und Anreicherung. Ein so erhaltener Faktor ist nicht mit dem oben bezeichneten Standardkorrekturfaktor ⁶¹⁾ identisch und wird im folgenden Korrekturfaktor genannt. Aus rechnerischen Gründen wurde der reziproke Wert verwendet.

$$RF = \frac{(\text{Fläche/ng})_{\text{Substanz}}}{(\text{Fläche/ng})_{\text{Standard}}}$$

Bei der Ermittlung der Blutspiegelkurven erstreckte sich der Bereich der zu analysierenden Substanzmengen von 6000 ng/ml bis 1 ng/ml. Alle in Frage kommenden Analysenproben mit der gleichen Menge Standard zu bestimmen, war nicht möglich. Die Substanzmenge aber durch Verdünnen des Ausgangsblutes zu regeln, wurde als ungeeignet angesehen, da sich so

für jede einzelne Analyse die Extraktionsbedingungen geändert und somit unterschiedliche Wiederfindungen ergeben hätten. Es wurden deshalb, der allgemeinen Forderung entsprechend, die Korrekturfaktoren mit gleichen Mengen Standard und zu bestimmender Verbindung ermittelt. Hierbei zeigte sich eine unterschiedlich starke Abhängigkeit des Korrekturfaktors der einzelnen Substanzen von der absoluten Konzentration ^{61, 69)}. Dadurch wurde für die Ermittlung der Blutspiegelkurven der interessierenden Amino-chinoline eine besondere Arbeitsweise erforderlich.

Von den Standards wurden im allgemeinen drei Lösungen mit einem Gehalt von 20 ng, 4 ng und 0,8 ng pro µl in 0,9-proz. Kochsalzlösung vom pH 4,0 hergestellt, da sie sich in saurer Lösung stabil zeigten und aus Salzlösungen im Gegensatz zu reinen wäßrigen Lösungen keine Verluste in der Wiederfindung auftraten. Mit 80-250 µl einer dieser Standardlösungen konnte jede erforderliche Substanzmenge den Analysenproben zugegeben werden, ohne deren Volumen wesentlich zu verändern.

Die Gewinnung der Blutspiegelkurven erfolgte in drei Schritten:

1. In einem Vorversuch wurden mit äußerem Standard ungefähre Blutspiegel ermittelt, die eine orientierende Blutspiegelkurve ergaben.
2. Die daraus entnommenen Werte bestimmten beim Hauptversuch die Zeitpunkte der Probennahme und die Zugabe der Mengen an innerem Standard.
3. Gleichzeitig neben diesem Versuch wurde in Vergleichsanalysen der Gang des Korrekturfaktors in Abhängigkeit von der absoluten Konzentration bestimmt. Hierzu wurden dieselben Mengen Standard plus Analysensubstanz mit normalem Heparinblut versetzt. Die aus diesen Vergleichsanalysen erhaltene Korrekturfaktorkurve ergab den für die Auswertung des Hauptversuches jeweils notwendigen Korrekturfaktor.

Mit Hilfe dieses etwas aufwendig erscheinenden Verfahrens war es jedoch möglich, den Fehler in der gesamten Bestimmungsmethode auf ein Mindestmaß zu reduzieren und die Blutspiegelkurven mit großer Sicherheit zu ermitteln. Eine einmalige Bestimmung bei jeweils fünf Versuchstieren war ausreichend. Bei Fällen, in denen eine Doppelbestimmung erfolgte, zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung.

4. Tierversuche

4. 1. Durchführung der Versuche

4. 1. 1. Dosierung der Aminochinoline

Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurde die Dosierung der Aminochinoline so gewählt, daß die toxische Belastung der Tiere stets etwa gleich war. Bei Applikation von 40 % der maximal tolerierten Dosis zeigten die Tiere keine äußerlich feststellbare Beeinträchtigung ihres Zustandes, so daß noch eine ungestörte Elimination zu erwarten war.

4. 1. 2. Applikation der Aminochinoline

Die Substanzen wurden den Mäusen einmal intraperitoneal appliziert. Diese bei Mäusen einfache und sichere Applikationsform konnte der schwierigen intravenösen, für die Bestimmung von Blutspiegelkurven aber geeigneten Art der Applikation vorgezogen werden, da bei i.p. Verabreichung die Resorption sehr schnell erfolgte. Wie aus den in Kapitel 1. 6. 1. dargestellten Blutspiegelkurven zu ersehen ist, stellt sich das Diffusionsgleichgewicht zwischen Blut und Gewebe sehr schnell ein, da Blutspiegel, die bereits nach 20 Minuten bestimmt wurden, im linearen Bereich der Kurve liegen. Bei Eröffnung des Bauchraumes der Mäuse nach Ablauf der Versuche konnten keine, die Resorption störenden Entzündungen des Peritoneums festgestellt werden. Die am hiesigen Institut ermittelten pharmakologischen Daten der untersuchten Verbindungen wurden zudem ebenfalls nach intraperitonealer Applikation erhalten.

Beim Vorversuch zur Gewinnung der orientierenden Blutspiegelkurve wur-

de drei Mäusen die Substanz appliziert, nach 2, 4 und 6 Stunden auf die in Kapitel 5.2.5. beschriebene Weise das Blut gewonnen und darin der jeweilige Blutspiegel bestimmt.

Im Hauptversuch wurde, um die biologische Streuung der Einzelergebnisse möglichst klein zu halten, jeweils vier Gruppen von fünf Tieren die Substanz appliziert. Entsprechend dem Verlauf der orientierenden Blutspiegelkurve wurden die Zeitpunkte der Blutabnahme festgelegt.

Die Vergleichsanalysen zur Gewinnung der Faktorkurve wurden entsprechend dem Hauptversuch mit jeweils 4-5 ml Blut von unbehandelten Tieren durchgeführt.

4.2. Auswertung und Ergebnisse der Tierversuche

Die Entnahme, Aufarbeitung und gas-chromatographische Bestimmung der Blutproben sowie die anschließende Auswertung der Analysenergebnisse zur Gewinnung der Korrekturfaktorkurve, der orientierenden und endgültigen Blutspiegelkurve erfolgte nach den in den Kapiteln 5.3. bis 5.5. angegebenen Arbeitsvorschriften.

4.2.1. Darstellung der Blutspiegelkurven

Nach D o s t ²⁶⁾ erfolgt das Absinken der Blutspiegelkurve der meisten körperfremden Stoffe im Sinne einer einfachen Exponentialfunktion. Bei der Darstellung im halblogarithmischen Koordinatensystem, in dem die Blutspiegelwerte auf der logarithmisch geteilten Ordinate und die Zeitwerte auf der linear geteilten Abszisse aufgetragen werden, wird deshalb eine Gerade erhalten. Dies konnte nicht in allen Fällen bestätigt werden, wie in Kapitel 4.2.3. näher ausgeführt wird. Die erhaltenen Blutspiegel-

kurven sind in den Abb. 1, 2 und 3 dargestellt und werden in Kap. 1.6.2. interpretiert.

4.2.2. Pharmakokinetische Daten aus den Blutspiegelkurven

Die biologische Halbwertszeit stellt ein anschauliches Maß für das Absinken des Blutspiegels dar. Sie wurde im direkten Verfahren nach D o s t ²⁶⁾ graphisch ermittelt, indem auf der Ordinatenachse zwei Konzentrationen $y_1 = 2y_2$ gewählt und die beiden Parallelen zur Abszissenachse durch die Ordinatenpunkte y_1 und y_2 bis zu ihrem Schnittpunkt mit der gezeichneten Eliminationsgeraden verfolgt wurden. Die zugehörigen Abszissenwerte t_1 und t_2 ergaben die Halbwertszeit

$$t_{1/2} = t_2 - t_1$$

Das Verteilungsvolumen, eine wichtige pharmakokinetische Rechengröße, stellt dasjenige Volumen dar, auf das die applizierte Substanzmenge zu verdünnen wäre, um den fiktiven Blutspiegelwert zur Zeit $t=0$ zu erhalten. Das Verteilungsvolumen V wurde nach folgender Formel ²⁶⁾

$$V \left[\text{ml} \right] = \frac{D \left[\mu\text{g} \right]}{a \left[\mu\text{g} / \text{ml} \right]}$$

errechnet, wobei D die Dosierung in μg Substanz pro g Tier und der Wert a den fiktiven Blutspiegel, zur Zeit $t=0$ angibt. Dieser Blutspiegel entspricht demjenigen, der sich ergeben würde, wenn sich das Diffusionsgleichgewicht des injizierten Stoffes zwischen Blut und Gewebsflüssigkeit schon unmittelbar nach der Injektion einstellen würde. Biologische Halbwertszeit und Verteilungsvolumen der untersuchten Amino-chinoline sind in Tab. 2 aufgeführt.

4. 2. 3. Nicht lineare Blutspiegelkurven

Abweichend von der allgemeinen Regel, daß bei halblogarithmischer Darstellung die Blutspiegelkurven der meisten körperfremden Stoffe linear abfallen, war bei Verbindung X etwa fünf Stunden nach Applikation eine Verzögerung im Absinken des Blutspiegels zu sehen und nach 11 Stunden wurde ein etwa dreimal so hoher Blutspiegel wie erwartet gefunden. Es lag deshalb der Verdacht nahe, daß mit der unveränderten Substanz ein gas-chromatographisch nicht abgetrennter Metabolit mitbestimmt wurde. Indem ein Teil der für die Gas-Chromatographie verwendeten Probe dünn-schicht-chromatographisch mit dem Fließmittel Benzol/Cyclohexan/Triäthylamin (45 + 45 + 10) untersucht und direkt fluorometrisch auf der Platte ausgewertet wurde, konnte jedoch gezeigt werden, daß nur unveränderte Substanz bestimmt wurde und es sich um eine komplexe Blutspiegelkurve handelt. Ein Absinken des Blutspiegels in der beobachteten Weise kann erfolgen ²⁶⁾, wenn der zunächst frei gelöste Anteil eines Stoffes verhältnismäßig schnell und der an Eiweißkörper gebundene Anteil später erst allmählich abgelöst wird und aus dem Blut verschwindet.

Bei der Verbindung VIII, deren Blutspiegel von allen untersuchten Amino-chinolinen am schnellsten abfällt, konnte eine langsame Ausscheidung über den erwarteten Zeitraum der Nachweisbarkeit im Blut hinaus beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte auf die hohe Toxizität von VIII zurückzuführen sein, durch die nach einer gewissen Zeit der Ausscheidungsmechanismus der Maus stark geschädigt sein dürfte.

4. 2. 4. Zusätzliche Auswertung der erhaltenen Gas-Chromatogramme

4. 2. 4. 1. Retentionszeiten der untersuchten Aminochinoline

Die nach der in Kapitel 5.5. angegebenen Arbeitsvorschrift untersuchten Aminochinoline zeigten entsprechend ihrer Polarität und ihrem Molekulargewicht unterschiedliche, in Tab. 8 aufgeführte Retentionszeiten.

Tabelle 8 :

Retentionszeit t_S der untersuchten Aminochinoline

Amino- chinolin	Retentionszeit t_S in Minuten			Trennsäule	Trenns.- Temp.
	Verbindung	Standard			
		Resochin	Plasmochin		
XI	1,39		1,04	OV-17 - Säule	250°
IX	1,93	1,46		2,5 %, 100 cm	250°
II	1,40		0,98	" "	250°
X	2,33	1,57		" "	250°
IV	1,84	1,03		" "	260°
I	0,95	-	-	" "	260°
III	1,24	0,80		" "	270°
V	1,56	0,80		" "	270°
VIII	1,09		0,61	" "	270°
VII	1,48	0,66		" "	280°
XII	1,03	1,55		OV-1 - Säule	250°
XIII	1,55		1,03	4 %, 150 cm	250°
VI	1,34	0,90		" "	268°

4.2.4.2. Nicht identifizierte Metaboliten

In den Gas-Chromatogrammen, die bei der Bestimmung der Blutspiegelwerte erhalten wurden, zeigten sich neben den eigentlich interessierenden Peaks der unverändert vorhandenen Substanzen gelegentlich zusätzliche Peaks mit längerer Retentionszeit, die in der Vergleichsanalyse fehlten. Sie wurden, weil ihre Menge zunahm, wenn die unverändert vorhandene Substanz abnahm, als Metaboliten angesehen. Auf Grund der Retentionszeiten, die in Tab. 9 aufgeführt sind, dürfte es sich um Substanzen handeln, die nicht wesentlich polarer sind als ihre Ausgangsverbindungen und unter anderem durch den, vom Resochin her bekannten, schrittweisen Abbau der Seitenkette^{74, 76, 75)} entstanden sein könnten. Von den untersuchten Substanzen zeigten die Verbindungen VI, II, IV, III, X und XIII Metaboliten im Gas-Chromatogramm, während bei den Verbindungen I, V, VII, IX, XI und XII keine Metaboliten-Peaks zu sehen waren.

Tabelle 9 :

Retentionszeit t_S der nicht identifizierten Metaboliten

applizierte Verbindung	Retentionszeit t_S in Min.		Trennsäule	Trenns.- Temp.
	Verbindung	Metabolit		
II	1,40	0,65 1,20	OV-17 - Säule	250°
XIII	1,55	1,33	2,5 %, 100 cm	250°
IV	1,83	2,23	" "	260°
X	1,86	2,70	" "	260°
III	1,25	0,60	" "	270°
VI	1,34	1,24	OV - 1 - Säule 4 %, 150 cm	268°

In Tabelle 10 ist das Verhältnis des Metaboliten zur unverändert ausgeschiedenen Substanz dargestellt. Es fällt dabei auf, daß die absolute Menge des Metaboliten meistens nach Erreichen eines bestimmten Wertes über eine längere Zeit nahezu gleich bleibt, während die Prozentanteile der Metaboliten, bezogen auf die unverändert im Blut vorliegende Substanz, mit der Zeit zunehmen.

Tabelle 10: Verhältnis von Metaboliten zu den unverändert im Blut
vorhandenen Amino chinolinen

Ver- bindung	Std. n. nach Applikation	ng/ml unver- bindung	ng/ml Metabolit	Metabolit in % unveränd. Verb.
VI 20 mg/kg	0	1450	-	-
	2, 33	425	wenig	-
	4, 10	176	wenig	-
	6, 12	58	30, 0	52 %
	8, 12	24	29	122 %
II 40 mg/kg	0	460	-	-
	4, 23	94	1, 8	2 %
	8, 77	18	2, 5 3, 1	14 % 17 %
	9, 95	12	0, 5 1, 4	4 % 12 %
IV 40 mg/kg	0	1600	-	-
	1, 6	535	-	-
	3, 77	124	10	8 %
	6, 1	14	9, 5	65 %
	7, 28	12	9, 2	77 %
III 40 mg/kg	0	5100	-	-
	1, 61	3550	wenig	-
	13, 9	572	wenig	-
	24, 65	143	wenig	-
	34, 9	30	8	27 %
	38, 5	13	5	40 %
X 40 mg/kg	0	4500	-	-
	3, 23	1240	43	3, 4 %
	5, 6	458	24	5, 3 %
	8, 45	234	11	4, 7 %
	11, 1	144	7	4, 6 %
XIII 20 mg/kg	0	2400	-	-
	2, 08	1104	94	8, 5 %
	4, 0	654	104	32 %
	6, 0	430	206	48 %
	12, 25	59	20	34 %

4.3. Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Blutspiegelkurven

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der gesamten Bestimmungsmethode wurden von den doppelt bestimmten Blutspiegelkurven die Korrelationskoeffizienten entsprechend in der von R e n n e r ⁹³⁾ angegebenen Form berechnet, um diese daraufhin zu untersuchen, ob sie sich im statistisch gesicherten Ausmaß voneinander unterscheiden. Es zeigte sich jedoch, wie aus der Tab. 11 zu ersehen ist, eine sehr gute Übereinstimmung der Korrelationskoeffizienten, deren Werte zwischen +1 und -1 liegen können. Ein negativer Koeffizient ergibt sich, wie im Fall der Blutspiegelkurven, wenn bei zunehmenden x-Werten die y-Werte zurückgehen. Je näher der Korrelationskoeffizient r bei +1 bzw. -1 liegt, umso intensiver ist der Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen. Aus seiner Höhe läßt sich die statistische Sicherheit ablesen, die in der Tabelle als Irrtumswahrscheinlichkeit P angegeben ist.

$$\text{Korrelationskoeffizient } r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

n = Zahl der Blutspiegelwerte

x = Zeit nach der Applikation in Stunden

y = log des Blutspiegelwertes in ng/ml Blut

Tabelle 11 :

Korrelationskoeffizient r der Blutspiegelkurven

Verbindung	Korrelationskoeffizient r			Irrtums- wahrscheinlich- keit P
	1. Bestimmung	2. Bestimmung	gemeinsame Kurve	
XII	- 0,980	- 0,995	- 0,968	P < 0,1 %
XIII	- 0,994	- 1,000	- 0,990	P < 0,1 %
IV	- 0,999	- 0,939	- 0,943	P < 0,1 %
V	- 0,992	- 0,997	- 0,993	P < 0,1 %
III	- 0,995	- 0,993	- 0,994	P < 0,1 %

4.4. Versuche zum Nachweis eines 5.6- bzw. 5.8-Chinolinchinons
im biologischen Material nach Applikation eines 6-Amino-
chinolins

4.4.1. Vergleichssubstanzen

Auf Grund der in Kapitel 1.6. geschilderten Ergebnisse wurde versucht, die beiden Chinone 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolinchinon und 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4-dimethyl-5.8-chinolinchinon als zwei der möglichen Metaboliten einiger 6-Aminochinoline in der Maus nachzuweisen. Hierzu waren die beiden Verbindungen in reiner Form als Vergleichssubstanzen erforderlich. Das 5.6-Chinolinchinon war von

Nickel⁸⁵⁾ durch Oxydation der Verbindung VI mit Kaliumhexacyanoferrat (III) gewonnen worden. Seine Struktur war durch Massenspektroskopie gesichert. Das 5.8-Chinolinchinon sollte durch Entmethylierung der Verbindung VI mit Bromwasserstoffsäure und anschließender Oxydation entsprechend der von Pratt und Drake²⁹⁾ angegebenen Darstellung von 8-Amino-5.6-chinolinchinon aus 5.6-Dimethoxy-8-amino-chinolin hergestellt werden. Es war jedoch nicht möglich, ein dünnsschicht- bzw. gas-chromatographisch einheitliches Produkt zu erhalten, da sich bei dem durch Chromatographie über Kieselgel- oder Polyamidsäulen aufgetrennten Gemisch aus den Einzelfractionen stets das ursprüngliche Gemisch wieder bildete. Nach Silylierung erhielt man im Gas-Chromatogramm zwei Hauptpeaks, während mit dem ursprünglichen Gemisch kein einheitliches Chromatogramm zu erzielen war. Es erschien deshalb bis zur Klärung dieses Verhaltens wenig sinnvoll, in Urin, Exkrementen, Blut und Leber nach dem 5.8-Chinolinchinon zu suchen. Die Suche beschränkte sich deshalb auf das 5.6-Chinolinchinon.

4.4.2. Extraktionsbedingungen für das 5.6-Chinolinchinon aus biologischem Material

Es zeigte sich, daß das 5.6-Chinolinchinon in Essigsäure-iso-amylester, Hexan und Äther nahezu unlöslich ist, sich aber in Chloroform, Methylenchlorid, Acetonitril und Toluol gut löst. Als Extraktionsmittel wurde deshalb Toluol gewählt, da es als einziges beim Schütteln keine Koagulation des zu untersuchenden Blutes hervorruft. Zur Alkalisierung diente 0,4 m Boratpuffer-Lösung von pH 9,25 bei Blut und gesättigte Natriumhydrogenkarbonat-Lösung für Urin, Exkremente und Leber. Für diese wurde Methylenchlorid als Extraktionsmittel verwendet. Bei Verwendung der Anreicherungsgläser war es nicht möglich, das 5.6-Chinolinchinon aus 7 ml organischer Lösung in ein wesentlich kleineres Volumen von

0,4 ml 2-proz. bzw. 10-proz. Schwefelsäure zu schütteln. Für die Anreicherung verwendete man deshalb Reagenzgläser mit spitzem Boden und eingeschliffenem Stopfen. Nach der in Kapitel 6.5. angegebenen Arbeitsweise wurden aus Mäuseexkrementen von 174 µg zugegebenem 5,6-Chinolinchinon 101 % wiedergefunden. Die Exkremente waren von 6 Tieren innerhalb 14 Stunden gesammelt worden.

4.4.3. Untersuchung von Urin, Exkrementen, Blut und Leber der Maus nach Applikation der Verbindung VI

Zum Nachweis des 5,6-Chinolinchinons wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Sechs Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 28,6 g wurden nach intraperitonealer Applikation von 20 mg/kg der Verbindung VI in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und die Exkremente 24 Stunden lang in einer Vorlage von 150 ml 0,2-proz. Schwefelsäure gesammelt.
2. Fünf Mäusen mit einem Durchschnittsgewicht von 27 g wurde 2 1/2 Stunden lang nach intraperitonealer Applikation von 20 mg/kg
 - a) die Blase in eine Vorlage von 0,2-proz. Schwefelsäure entleert,
 - b) das Blut in eine Vorlage von 3 ml Heparinlösung entnommen und
 - c) die Lebern entfernt und sofort in Trockeneis eingefroren.

Sämtliche Proben wurden sofort eingefroren und dann in der im Kapitel 6.5. beschriebenen Weise aufgearbeitet.

4.4.3.1. Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolinchinon

In den Extrakten aus Urin und Exkrementen konnte 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolinchinon nachgewiesen werden.

Im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol/

Methyläthylketon (80 + 10 + 10), nach dem Besprühen mit saurer äthanolischer 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung als purpurroter Fleck mit hRf 55 und auf Polyamid-Fertigplatten mit dem Fließmittel Wasser/Äthanol/Methyläthylketon/Acetylaceton (65 + 15 + 15 + 5) als gleichgefärbter Fleck mit hRf 59. Im Gas-Chromatogramm mit einer 150 cm langen Trennsäule mit 4 % OV-1 bei 220^o wurde ein Peak mit der Retentionszeit $t_S = 0,88$ Min. erhalten, der dem der Vergleichssubstanz entsprach.

Im Blut und in der Leber konnte kein 5.6-Chinolinchinon nachgewiesen werden.

4.4.3.2. Identifizierung von 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolinchinon als Phenazinderivat

Durch Umsetzung von 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolinchinon in Toluol mit o-Phenylendiamin in Gegenwart von Eisessig zu 5-Methoxy-1.3-dimethyl-pyrido- [3.2-a] -phenazin war es möglich, das Chinon im Nanogramm-Bereich gas-chromatographisch zu identifizieren. Fünf Mäusen wurde zwei Stunden lang nach intraperitonealer Applikation von 20 mg/kg der Verbindung VI die Blase in eine Vorlage von 0,2-proz. Schwefelsäure entleert. Bei pH 7,8 - 8,0 wurde mit Methylenchlorid extrahiert und die getrocknete organische Phase i.Vak. bei 38^o Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl Toluol aufgenommen und in das Phenazinderivat überführt (s. Kapitel 6.6.). Mit einer 150 cm langen Trennsäule mit 4 % OV-1 erhielt man bei 292^o im Gas-Chromatogramm einen Peak mit einer Retentionszeit von $t_S = 3,31$ Min., die mit der eines Vergleiches übereinstimmte.

4.4.4. Ergebnis der Versuche

In drei Versuchen konnte nach intraperitonealer Applikation der Verbindung VI das 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolinchinon dünn-schicht- und gas-chromatographisch aus Urin von Mäusen nachgewiesen werden. Innerhalb von 2 1/2 Stunden nach Applikation wurden von der verabreichten Menge 2,3 % als 5,6-Chinolinchinon und 4,2 % unveränderte Substanz ausgeschieden. In einem zusätzlichen Versuch wurden 12 Mäusen 30 mg/kg der Verbindung VI i.p. appliziert und zwei Stunden lang der Urin in einer Vorlage von 1 ml 0,2-proz. Schwefelsäure gesammelt.

Parallel dazu wurden 10 µl (= 30 µg) der Injektionslösung zu einer Vorlage von 1 ml 0,2-proz. Schwefelsäure gegeben und der Urin von 10 unbehandelten Tieren in der Vorlage aufgefangen. Die Proben wurden wie in Kap. 6.5. beschrieben aufgearbeitet und gas-chromatographisch untersucht. Unerwarteterweise wurde im Zusatzversuch ebenfalls 5,6-Chinolinchinon gefunden und zwar etwa 2/3 der Menge, die im Urin der behandelten Tiere bestimmt wurde.

Vor Beginn des Versuches waren 30 µl (= 300 µg) Applikationslösung extrahiert und untersucht worden. Es konnte weder dünn-schicht- noch gas-chromatographisch 5,6-Chinolinchinon nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Versuche läßt sich zwar nicht entscheiden, ob es sich bei dem im Urin von Mäusen nach Applikation der Verbindung VI gefundenen 5,6-Chinolinchinon um einen vom Organismus gebildeten Metaboliten handelt oder ob es ein im Harnwegsystem der Maus unspezifisch entstandenes Oxydationsprodukt darstellt. Die bisherigen Befunde sprechen aber nicht gegen die Annahme eines 5,6-Chinolinchinons als eines der möglichen Oxydationsprodukte der 6-Aminochinoline im Körper, sondern lassen dies als besonders wahrscheinlich erscheinen. Bei der Suche nach den Oxydationsprodukten der verschiedenen 6-Aminochinoline im Körper

sollte deshalb dieses Chinon besonders beachtet werden. Die Unmöglichkeit, das 5,6-Chinolinchinon in Blut und Leber nachzuweisen, dürfte auf eine Eiweißbindung des o-Chinons zurückzuführen sein, welche bei den von mir beschriebenen Aufarbeitungsverfahren nicht berücksichtigt wurde.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

5. Arbeitsvorschriften für die gas-chromato-graphische Bestimmung von Blutspiegelkurven

5.1. Allgemeine Angaben

5.1.1. Geräte

Von der Firma Hewlett-Packard GmbH, Böblingen:

Gas-Chromatograph 5755 G mit Doppelflammenionisationsdetektor, modifiziert zum stickstoffselektiven Detektor durch Einbausatz 15161 A und später erweitert zum hochempfindlichen NsFID 15161 B;

1 mV Zweikanal-Kompensations-Linienschreiber Moseley H 10-7128 A; Digital-Integrator mit tangentialer Integration und eingebautem Drucker 3370 B.

Eigenbau-Änderungen am Detektor nach Kapitel 3.4.2., Abb. 9 und 10. GC, Integrator und Schreiber wurden in Serie hintereinander geschaltet.

Gase der Firma Linde AG, Nürnberg, in Stahlflaschen mit 150 atü. Helium 99,999 %; Wasserstoff, nachgereinigt; Synthetische Luft (20 % Sauerstoff und 80 % Stickstoff).

Zweistufige Druckminderer mit Arbeitsbereich 0 - 10 atü der Firma Messer - Griesheim.

Gasreinigungsröhren aus Kupfer 22 mm x 350 mm mit Molekularsieb 5 A in Stäbchenform, E. Merck AG, Darmstadt.

GC-Säulen aus "Duran 50" - Glas, 6,3 mm A.D., 3 mm I.D., in den Längen: 1 m, 1,50 m, 2 m, Glasbläserei Vorndran, Erlangen.

Apparatur zum Imprägnieren der mit Trägermaterial gefüllten Säulen.

Eigenbau nach Kapitel 5.1.46, Abb. 11, 11a.

Mikroliterspritze 701 NW/G, 10 μ l und Mikroliterspritze 710 N, 100 μ l, beide mit einzementierter Nadel der Hamilton Company Inc., Whittier/Calif., bezogen durch G. Schmidt, Hamburg.

Mikroliterspritze 10 A/RNGP, 10 μ l, mit auswechselbarer Nadel, Scientific Glass Engineering Pty Ltd., Melbourne, bezogen durch Biotronik Wissenschaftliche Geräte GmbH, München.

Becherzentrifuge, STOCK, Marburg/Lahn, mit 8 freiausschwingenden 1 Liter-Bechern. Abstand von der Zentrifugenmitte bis zur Bechermitte 40 cm. Maximal 3400 g.

Einsätze aus Trovidur^(R) für Schüttelgläser und Anreicherungsgläser, Eigenbau nach Kapitel 3.1.3., Abb. 5.

Ultraschallbad "Sonorex", Typ RK 82, 40 kHz, Bandelin Electronic KG, Berlin.

Drehvorrichtung für Anreicherungsgläser im Ultraschallbad, Eigenbau nach Kapitel 5.4.3.

Anreicherungsgläser mit zugehörigen Teflonstopfen, Eigenbau nach Kapitel 3.3.1.2, Abb. 7.

Schüttelgläser aus "Duran 50" - Glas, Länge 150 mm, Außendurchmesser 19 mm, Wandstärke 1,8 mm, mit eingeschliffenen Hohlglasstopfen, NS 14,5; Inhalt: 25 ml.

Schüttelmaschine mit kreisender Bewegung, Frequenz 120 U/Min., Auslenkung 100 mm, Kippbewegung 30 mm.

Einmal-Spritzen sterilisiert, 1 ml, Primo Record, A-Sik, Dänemark. Injektionskanülen V2A-Stahl, Nr. 20.

Enzym-Meßpipetten, 100 μ l, 200 μ l, 500 μ l, 1 ml, 2 ml.

2 automatische Mikrobüretten, 10 ml.

Kleinhomogenisator, Tissue-Grinder mit Teflonkolben, 10 ml, Thomas, Phila., USA.

Stoffwechselkäfig für Mäuse⁸⁰⁾ mit Rost aus Glasstäben, 2,5 mm ϕ , Maschenweite 8 mm.

5.1.2. Materialien und Reagenzien

Trägermaterial: Chromosorb W (AW-DMCS) H. P., 80-100 mesh, der Firma Johns-Manville Corp., New York, bezogen durch Lehmann & Voss Co., Hamburg.

Trennflüssigkeiten: OV-1, OV-101, OV-17 der Ohio Valley Chemical Company, bezogen durch Hewlett-Packard, Böblingen.

Toluol p.a., E. Merck AG, Darmstadt - n-Hexan zur Synthese (LAB), Merck - Essigsäure-iso-amylester rein, Merck; nach Destillation über eine 40 cm lange Vigreux-Kolonne wurde die Fraktion mit dem K_p 138° verwendet.

Heparin Natriumsalz U.S.P. XVI, purum 160 I.E./mg, Fluka AG, Buchs. Benzyltrimethylammoniumchlorid rein, Fluka AG, Buchs. NaCl p.a., Merck - NaOH p.a., Merck - H_2SO_4 p.a., 95-97 %, Merck - Dimethyldichlorsilan, Analabs, Hamden, Connecticut, bezogen durch Auriema-Europe, Brüssel.

N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid, Schuchardt, München.

Heparinlösung: 100 mg Heparinnatriumsalz in 100 ml 0,9-proz.

NaCl-Lösung.

Physiologische Kochsalzlösung von pH 4,0 : 9 g NaCl p.a. und 1 ml 2-proz. H_2SO_4 zu 1 l in dest. Wasser gelöst.

Alkalisierungslösung: 40 g Benzyltrimethylammoniumchlorid und 1,5 g NaOH zu 100 ml in dest. Wasser gelöst.

0,75 - proz. NaCl-Lösung, sterilisiert.

5.1.3. Reinigung der Glasgeräte

Nach vorheriger Reinigung mit einer Bürste wurden die Glasgeräte über Nacht in eine 3-proz. Extran^(R) - Lösung gelegt und mit warmem Lei-

tungswasser sofort gründlich gespült. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser nachgespült. Man legte die Glasgeräte in nichtrostende Drahtkörbe und trocknete sie bei 105° im Trockenschrank. Die Bechergläser für die Blutproben wurden mit Alufolie bedeckt aufbewahrt.

5.1.4. Herstellung von Trennsäulen

5.1.4.1. Reinigung der Glassäulen

Die Glassäule wurde mit einem Silikongummischlauch, ohne eine Sicherheitsflasche dazwischenzuschalten, direkt an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Man saugte eine 3-proz. Extran^(R)-Lösung ein, klemmte den zur Pumpe führenden Schlauch ab und ließ die gefüllte Säule über Nacht stehen. Die Lösung wurde in die Pumpe gesaugt und die Säule mit insgesamt etwa 3 l Wasser von $40-50^{\circ}$ gespült. Man unterbrach dreimal das Saugen und ließ die gefüllte Säule etwa 2 Minuten lang stehen. Anschließend spülte man auf die gleiche Weise nacheinander mit etwa 500 ml destilliertem Wasser und 200 ml reinem Methanol nach. Dann wurde die Säule sofort, ohne Luft durchzusaugen, bei 150° im Trockenschrank getrocknet.

5.1.4.2. Silanisierung der Glassäulen

Man ließ die Säule an der Luft abkühlen, um den gewünschten Wasserfilm zu erzielen ⁷⁷⁾ und schloß sie wieder mit einem trockenen Silikongummischlauch an die Wasserstrahlpumpe an. Eine frisch bereitete Lösung von 10 % (V/V) Dimethyldichlorsilan in Toluol wurde eingesaugt, der Schlauch unmittelbar am Säulenende abgeklemmt und das andere Ende mit einer Polyäthylenschlauchkappe (Schutzkappe einer Einmal-Injektionspritze) verschlossen. Nach 10 Minuten saugte man die Lösung durch

die Pumpe ab, spülte mit 300 ml Toluol nach und ließ die Säule mit Methanol gefüllt 5 - 10 Minuten stehen. Zum Schluß wurde solange mit Methanol langsam durchgespült, bis sich mit pH-Papier keine Säure mehr nachweisen ließ. 100 ml Methanol waren meist ausreichend. Sollte die Säule nach dem Trocknen bei 110° nicht sofort mit Trägermaterial gefüllt werden, wurde sie mit Polyäthylenschlauchkappen luftdicht verschlossen.

5.1.4.3. Vorbehandlung des Trägermaterials

10 g Trägermaterial, Chromosorb W (AW-DMCS) H.P., 80-100 mesh, wurden in einem hohen 600 ml Becherglas mit 150 ml Methanol p.a. durch kreisendes Schwenken aufgewirbelt. Nach ungefähr 30 Sekunden wurde der trübe Überstand mit den obenauf schwimmenden, feinen Anteilen abgegossen. Man wiederholte das Aufschlämmen und Dekantieren so lange, bis der Überstand klar blieb, was meist nach einem Verbrauch von insgesamt etwa 1,5 l Methanol erreicht war. Das auf diese Weise vom Abrieb befreite Trägermaterial wurde in ein weites 250 ml Becherglas gespült und das sich abtrennende Methanol wiederholt abgegossen. Anschließend legte man das Becherglas in den kalten Trockenschrank, den man nur bei angelehnter Tür auf 130° aufheizte. Nachdem die Hauptmenge an Methanol verdampft war, wurde der Schrank geschlossen und über Nacht auf dieser Temperatur gehalten. Nach dem Erkalten im Exsikkator über Phosphorpentoxid-Trockenmittel "goß" man das nun gebrauchsfertige Trägermaterial in ein luftdicht verschließbares Weithals-Glasgefäß und bewahrte es im Exsikkator auf.

Bei der weiteren Handhabung wurde das Trägermaterial so schonend wie möglich behandelt und nur noch "umgegossen", um jeden weiteren Abrieb zu vermeiden.

5.1.4.4. Füllen der Glassäule mit Trägermaterial

Das Ende der gereinigten und silanisierten Säule wurde mit einem dichten, knapp 1 cm langen Glaswollepfropf verschlossen und durch ein Swagelock^(R) - Verbindungsstück, dessen Bohrung im Innern nur 4 mm beträgt (HP Nr. 0100-0128), mit einem 10 cm langen Polyäthylenschlauchstück verschraubt. Ein Glaswollebausch im Verbindungsstück hatte die Aufgabe, den Verschluß der Säule zu sichern. Auf den Säulenanzug setzte man einen 50 mm weiten Plastiktrichter, dessen Stiel vorher, auf das Außenmaß der Säule passend, zugeschnitten worden war.

Entsprechend dem Volumen der zu füllenden Säule und der Füllichte des Trägermaterials von 0,3 - 0,4 g/ml wurden bei einer 200 cm (150 cm, 100 cm) langen Säule mit einem Volumen von 14,7 ml (11 ml, 7,3 ml) Trägermaterial abgewogen. Nun schloß man die Säule mit dem Polyäthylenschlauchstück über eine Sicherheitsflasche an die Wasserstrahlpumpe an. Während man die Säule an den Windungen locker hielt, ließ man spatenweise so viel Trägermaterial in die Säule einrieseln, bis sich durch die Saugwirkung der Pumpe die Säule vom Ende her etwa 10 cm weit gefüllt hatte, öffnete den Hahn der Sicherheitsflasche und klopfte unter schwachem Saugen mit einem Bleistift vibrierend die Füllung zusammen. Dann wurde kurz kräftig gesaugt und erneut bei schwachem Sog geklopft, um anschließend bei geschlossenem Lüftungshahn Trägermaterial für weitere 10 cm Füllung einrieseln zu lassen. Man öffnete den Hahn wieder, verdichtete die Packung durch tangentiales Klopfen vom Säulenende her und nach erneutem kräftigen Saugen klopfte man, bis keine Volumensverminderung mehr zu erkennen war. In Abschnitten von 10 cm wurde die Säule im Rhythmus - einfüllen und stark saugen; schwach saugen und klopfen; kurz kräftig saugen; schwach saugen und klopfen; wieder einfüllen - möglichst schonend und dicht gefüllt. Zum Schluß wurde die Säule mit einem Glaswollepfropfen so verschlossen, daß sie am Ende noch 5 cm leer blieb.

Abbildung 11 :

Apparatur zum Umpumpen einer
Imprägnierlösung durch eine mit
Trägermaterial gefüllte Säule.

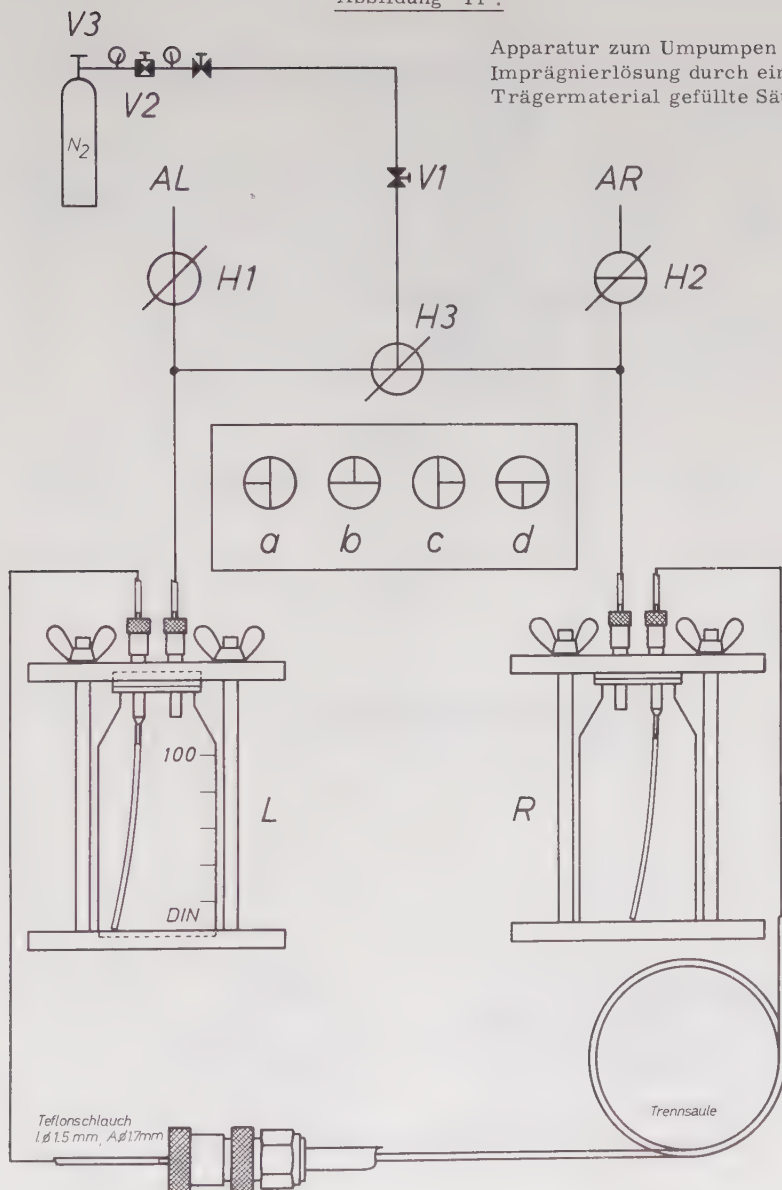
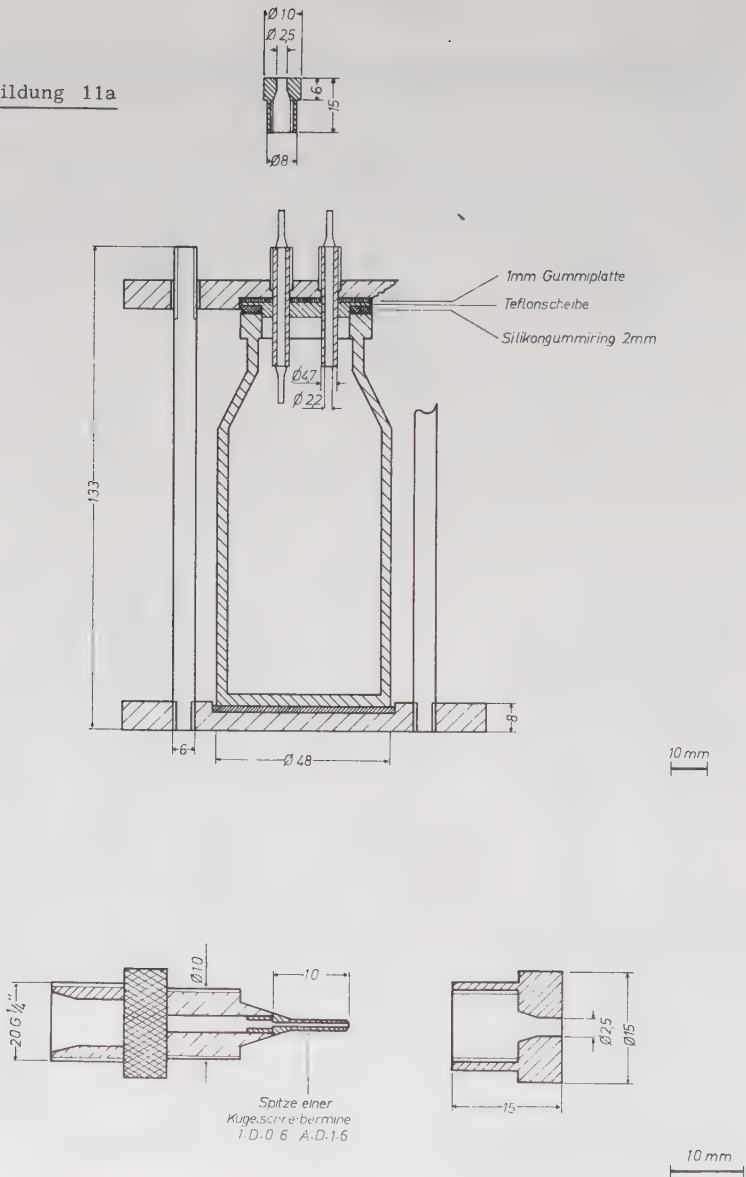


Abbildung 11a



5. 1. 4. 5. Herstellung der Imprägnierlösungen

Um eine etwa 4-proz. Belegung des Trägermaterials mit den Trennflüssigkeiten OV-1 und OV-101 zu erreichen, wurde eine 2,2-proz. (g/ml) und um eine etwa 2,5-proz. Belegung mit OV-17 zu erreichen, eine 1,45-proz. (g/ml) Imprägnierlösung hergestellt.

OV-1 : Zu 50 ml Toluol p. a. wurden 1,1 g feste OV-1 -Trennflüssigkeit gegeben und über Nacht stehengelassen. Den stark gequollenen, in Toluol fast unsichtbaren Silikongummi brachte man dann im Ultraschallbad bei 50° in Lösung.

OV-101 : 1,1 g flüssige OV-101 -Trennflüssigkeit wurden im Ultraschallbad in 50 ml Toluol p. a. gelöst.

OV-17 : 0,66 g feste OV-17 -Trennflüssigkeit wurden im Ultraschallbad in 45 ml Toluol p. a. gelöst.

5. 1. 4. 6. Imprägnieren der Säulenfüllung

Die mit Trägermaterial gefüllte Säule wurde an die in Abb. 11 beschriebene Imprägnierapparatur angeschlossen. In das Gefäß L füllte man die Imprägnierlösung, verschraubte fest den Deckel und klemmte den zur Säule führenden Teflonschlauch kurz vor der Säule ab. Das leere Gefäß R wurde ebenfalls fest verschraubt. Bei geschlossenem Hahn H-1 und Hahn H-3 in Stellung (a) evakuierte man über den Ausgang A-R das Gefäß R und die Säule. War die Luft völlig aus dem Trägermaterial entfernt, wurde Hahn H-2 geschlossen und die Klemme am Teflonschlauch langsam geöffnet. Nachdem sich die Säule mit Imprägnierlösung gefüllt und der Druck sich in beiden Gefäßen ausgeglichen hatte, wurden die Nadelventile V-1 und V-2 leicht geöffnet und durch langsames Eindrehen der Spindel am Druckminderer der Vordruck auf etwa 0,5 atü eingestellt. Sobald die Im-

prägnierlösung im Teflonschlauch zwischen Säule und Gefäß R zu fließen begann, wurde mit Hilfe des Nadelventiles V-1 der Volumenfluß auf etwa 0,7 - 0,8 ml/Min. eingeregelt. Dies entsprach einer Geschwindigkeit von 1 cm/Sek. im Teflonschlauch, der als Strömungsmesser diente (8 cm = 0,1 ml). Nach etwa 60 Minuten war fast die gesamte Imprägnierlösung durch die Säule in das Gefäß R gedrückt. Man schloß Hahn H-2, drehte den Dreiweghahn H-3 im Uhrzeigersinn in Stellung (c) und öffnete Hahn H-1 . Dadurch wurde die Imprägnierlösung wieder zurück in Gefäß L gedrückt. Waren beide Gefäße etwa gleich gefüllt, schloß man Hahn H-2 und brachte Hahn H-3 in Stellung (d). Nun wurden noch die Ventile V-2 und V-3 geschlossen, bevor die Säule über Nacht unter Druck stehen blieb. Anschließend wurde die Imprägnierlösung noch einen Tag lang wechselweise durch die Säule gedrückt, was einem Durchfluß von etwa 500 ml entsprach. Kurz bevor Gefäß L beim letzten Durchgang leer war, schloß man Ventil V-1 und erhöhte den Vordruck auf 5 atü. Hahn H-1 wurde geöffnet und mit Ventil V-1 und einem Seifenfilm-Strömungsmesser am Ausgang A-L ein Gasfluß von etwa 1 ml/Min. eingeregelt. Hahn H-1 wurde wieder geschlossen, Hahn H-2 geöffnet und Hahn H-3 in Stellung (a) gedreht. Die Imprägnierlösung wurde nun sehr langsam im Verlauf von etwa 12 Stunden über Nacht aus der Säule gedrückt. Nach etwa 48 Stunden erschien der Träger nicht mehr feucht, man entfernte Gefäß R und erhöhte den Gasdurchfluß auf 20 ml/Min. . Erst nachdem kein Toluolgeruch mehr wahrzunehmen war, wurde das Durchblasen mit nachgereinigtem Stickstoff beendet.

5.1.4.7. Konditionierung der Trennsäulen

Zur thermischen Alterung der Trennsäule wurde diese in den kalten GC-Ofen eingebaut, jedoch nicht an den Detektor angeschlossen. Bei einem Trägergasstrom von 60 ml/Min. und einer Heizrate von 6°/Min. wurde

auf 250° aufgeheizt. Man hielt diese Temperatur 1 Stunde lang und unterbrach dann den Trägergasstrom. Mit 10°/Min. wurde anschließend auf 340° aufgeheizt. Nach 4 Stunden ließ man die Ofentemperatur auf 280° absinken und stellte wieder einen Trägergasstrom von 60 ml/Min. her. Die Einspritzblocktemperatur wurde jeweils entsprechend nachgeregelt. Nach 24 Stunden wurde die Trennsäule an den Detektor angeschlossen und die Güte der Imprägnierung durch Einspritzen von Cholesterol geprüft.

5.2. Tierversuche

5.2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse des Stammes NMRI/Orig. Kisslegg aus den Medizinischen Versuchstierzuchten S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu, verwendet. Die Tiere erhielten als Standard-Diät Altromin^(R) der Firma Altrogge, Lage/Lippe, und Wasser ad libitum. Sie wurden bei täglich 12 Stunden Tageslichtbeleuchtung mit Leuchtstoffröhren, 55-65 % relativer Luftfeuchte und einer Raumtemperatur von 23-25° gehalten.

Zur Zeit der Versuche waren die Mäuse etwa 10 Wochen alt, 21-25 g schwer und wurden zu 20 Stück in einem großen Makrolon^(R)-Käfig (Bodenfläche: 600 cm²) gehalten.

Zum Auffangen der Exkremente wurden die Mäuse in einen Stoffwechselkäfig gesetzt.

5. 2. 2. Substanzen

Mit Ausnahme von Resochin^(R), das als Diphosphat verwendet wurde, lagen alle Aminochinoline als Naphthalin-1,5-disulfonate vor.

In Tab. 12 ist der Basengehalt der einzelnen Substanzen aufgeführt.

Tabelle 12: Basengehalt der untersuchten Aminochinoline

6-Aminochinoline:	VIII	55,5 %
	I	52,0 %
	II	54,4 %
	III	54,4 %
	IV	56,7 %
	V	55,3 %
	VI	56,4 %
	VII	57,4 %
4-Aminochinolin:	XIII	62,0 %
5-Aminochinolin:	IX	56,4 %
7-Aminochinolin:	X	56,4 %
8-Aminochinoline:	XII	52,2 %
	XI	54,4 %

5. 2. 3. Herstellung der Injektionslösungen

Die dünn-schicht-chromatographisch einheitlichen Substanzen wurden in steriler 0,75-proz. Kochsalzlösung so gelöst, daß die zu applizierende Menge an Substanz, entsprechend der gewünschten Dosis pro kg, in so

vielen μ l der Lösung enthalten war, wie das 10fache Körpergewicht der Mäuse in Gramm angab. Bei Dosis 20 mg/kg wurden also 20 mg Base in 10 ml gelöst.

Alle Dosisangaben beziehen sich auf den Basenanteil der Substanzen. Die Injektionslösungen wurden täglich frisch hergestellt.

5. 2. 4. Applikation der Injektionslösungen

Die ausgewählten Tiere wurden gewogen und mit wäßriger Pikrinsäure-Lösung gekennzeichnet. Entsprechend ihrem Gewicht wurde den Mäusen die Injektionslösung in den Bauchraum, i. p. , injiziert. Man verwendete 1 ml Einmal-Spritzen mit Kanülen Nr. 20. Bei Hauptversuchen ließ man zwischen den einzelnen Tieren einen zeitlichen Abstand von 4 Minuten.

Für die Injektionen in die Schwanzvene wurden Kanülen Nr. 23 verwendet.

5. 2. 5. Blutabnahme

Ein weites 50 ml Becherglas mit Vorlage wurde auf 2 Stellen nach dem Komma genau gewogen und in einen mit feinkörnigem Eis gefüllten Styroporbecher gestellt. Sodann wurde in einem Deckelglas eine Maus mit Äther narkotisiert. Man legte die linke Handkante, mit der Außenfläche zum Kopf, auf die Schwanzwurzel der mit dem Bauch auf der Unterlage liegenden Maus, führte den Schwanz nach vorne zwischen Ring- und Mittelfinger hindurch und faßte mit Daumen und Zeigefinger fest das Nackenfell. Dadurch wurde das Blut im Kopf gestaut und eines der hervorquellenden Augen mit einer chirurgischen Pinzette ruckartig entfernt. Das sofort austretende Blut fing man unter leichtem Schwenken in der eisgekühlten Vorlage auf. Die ausgebluteten Mäuse tötete man im Äther. Der Zeitaufwand für ein Tier betrug 3 - 4 Minuten. Nachdem man auf diese Weise das

Blut jeweils einer Gruppe in derselben Vorlage aufgefangen hatte, bestimmte man das Gewicht des Blutes und errechnete durch Division mit 1,03 das Volumen in ml. Das Becherglas mit Heparinblut wurde sofort, mit Alufolie verschlossen, in die Tiefkühltruhe gestellt.

5.3. Gewinnung der Proben

5.3.1. Vorversuche

Drei Mäusen wurde die Substanz appliziert und nach etwa 2, 4 und 6 Stunden in der beschriebenen Weise das Blut abgenommen. Als Vorlage dienten jeweils 0,6 ml Heparinlösung pro Tier.

5.3.2. Hauptversuche

Vier Gruppen von jeweils 5 Mäusen applizierte man im Abstand von 4 Minuten die Substanz. Entsprechend dem Verlauf der orientierenden Blutspiegelkurve, die man aus den Vorversuchen erhielt, wurden die Zeitpunkte der Blutabnahme festgelegt. Die dabei zu erwartende Menge der zu bestimmenden Substanz konnte ebenfalls aus dieser Kurve abgelesen werden. Die Blutabnahme erfolgte in der beschriebenen Weise. Als Vorlage dienten 3,0 ml Heparinlösung (0,6 ml pro Tier), zu der die gleiche Menge innerer Standard hinzupipettiert wurde, die für die Substanz in der Gesamprobe erwartet wurde. Resochin und Plasmochin wurden als innere Standards verwendet. Aus der Tabelle 13 ist zu entnehmen, für welche Substanzen der jeweilige Standard verwendet wurde.

Tabelle 13: Zuordnung der Aminochinoline zu den beiden Standards

Standard		Aminochinoline									
Resochin	:	I	III	IV	V	VI	VII	IX	X	XII	
Plasmochin	:	II	VIII	XI	XIII						

Es wurde immer mit dem Basenanteil des Standards gerechnet. Als Lösungsmittel verwendete man physiologische Kochsalzlösung von pH 4,0. Drei verschiedene Lösungen mit 20 ng/ μ l, 4 ng/ μ l und 0,8 ng/ μ l waren im allgemeinen ausreichend, um alle Mengen an Standard in einem Volumen von 80-250 μ l zur Probe hinzugeben zu können.

Verdünnungsreihe der Lösungen des inneren Standards:

Lösung A : 20 ng/ μ l, für die Zugabe von 5000 - 1000 ng.
2 mg Standard wurden im Meßkolben zu 100 ml gelöst.

Lösung B : 4 ng/ μ l, für die Zugabe von 1000 - 400 ng.
2 ml der Lösung A im Meßkolben zu 10 ml verdünnt.

Lösung C : 0,8 ng/ μ l, für die Zugabe von 400 - 50 ng.
2 ml der Lösung A im Meßkolben zu 50 ml verdünnt.

5.3.3. Vergleichsanalysen

Entsprechend dem Hauptversuch pipettierte man aus einer Lösung zur Vorlage von 3 ml Heparinlösung dieselben Mengen Standard und zu bestimmende Substanz hinzu und ließ dann in der beschriebenen Weise 4-5 ml Blut von unbehandelten Mäusen zutropfen.

Die Lösungen wurden entsprechend der Verdünnungsreihe des Hauptversuches hergestellt.

Lösung A : je 20 ng/ μ l innerer Standard + zu bestimmende Substanz

Lösung B : je 4 ng/ μ l innerer Standard + zu bestimmende Substanz

Lösung C : je 0,8 ng/ μ l innerer Standard + zu bestimmende Substanz

5. 4. Aufarbeitung der Blutproben

Hauptversuch und Vergleichsanalysen wurden jeweils nebeneinander durchgeführt und aufgearbeitet.

5. 4. 1. Hämolyse

Das Blut wurde durch kurzes Einstellen der gefrorenen Proben in lauwarmes Wasser und anschließendes Auftauen im Ultraschallbad hämolysiert. Hatten die Proben über Nacht in der Gefriertruhe gestanden, genügte ein einmaliges Auftauen. Frische Proben wurden zweimal in einer Mischung aus Kohlensäureschnee und Aceton im Dewar-Gefäß eingefroren und im Ultraschallbad wieder aufgetaut.

5. 4. 2. Extraktion der Aminochinoline

Die hämolysierten Blutproben wurden in die 25 ml Schüttelgläser überführt und 8 ml einer Mischung aus n-Hexan / Essigsäure-iso-amylester (9 + 1) langsam hinzupipettiert. Aus einer Mikrobürette mit Vorratsgefäß ließ man anschließend an der Glaswandung die berechnete Menge Alkalisierungslösung (0,3 ml/ml Blut) zulaufen, welche sich unter die

wäßrige Phase schichtete. Mit einem kräftigen Stickstoffstrom, der durch eine Glaspipette in die Gläser geleitet wurde, verdrängte man die Luft und sättigte den Kopfraum mit organischer Phase. Man verschloß fest mit angefeuchteten Hohlglasstopfen, die mit Wasser eingedichtet wurden, steckte die Gläser in einen viereckigen Holzklötz mit entsprechenden Bohrungen und sicherte sie mit einer Gummilasche. Auf einer Schüttelmaschine mit kreisender Bewegung wurden die Gläser dann in waagrechter Lage 25-30 Minuten lang geschüttelt. Nachdem man die Stopfen durch Gummikappen von 50 ml Injektionsflaschen ersetzt hatte, stellte man die Gläser in die in Abb. 5 beschriebenen Zentrifugeneinsätze und zentrifugierte 10 Minuten lang bei 3000 U/Min. (= 3400 g), wobei sich oben die blutorganische Phase abschied.

5. 4. 3. Anreicherung der extrahierten Aminochinoline

Man verwendete dazu eigene, in Abb. 7 beschriebene Anreicherungsgläser, deren Körper mit den dafür vorgesehenen Teflonstopfen (Abb. 7) verschlossen waren. Mit einer 5 ml Meßpipette, die vorher innen mit auf Vorrat hergestellter, blutorganischer Phase von unbehandelten Tieren benetzt worden war und einem Peleus-Ball hob man 7,0 - 7,5 ml des klaren Überstandes ab, legte die Spitze der Pipette an den Rand des Halses des schräg gehaltenen Anreicherungsglases und ließ die blutorganische Phase an der Wandung zulaufen. In der gleichen Weise ließ man aus einer Mikrobürette mit Vorratsgefäß 0,4 ml einer 2-proz. Schwefelsäure zulaufen. Mit Filtrierpapier entfernte man noch eventuell am Halsrand verbliebene Säurereste und verschloß die Gläser mit den entsprechenden Teflonstopfen, schüttelte sie kräftig von Hand und tauchte sie einzeln etwa 10-20 Sekunden in das mit destilliertem Wasser gefüllte Ultraschallbad, bis eine gleichmäßige, milchige Trübung zu sehen war. Anschließend wurden die Gläser noch drei Minuten lang im Ultraschallbad mit 3 U/Min.

gedreht. Man verwendet dazu einen stufenlos regelbaren Motor, dessen waagrecht liegende Welle durch ein 25 cm langes Messingrohr verlängert war, auf dem acht polyäthylenüberzogene Federclips (Nr. P 760, 16 mm ϕ ; BRAND, Wertheim) in einer Ebene, jeweils vier einander gegenüber, aufgeschraubt waren. Dann stellte man die Anreicherungsgläser mit dem Hals nach unten in den in Abb. 5 beschriebenen Einsatz und zentrifugierte während 10 Minuten mit 2600 U/Min. ($\approx$ 3100 g) die Schwefelsäure in den Hals der Gläser.

Die großen Teflonstopfen wurden etwas angehoben und mit Filtrierpapier, das evtl. bis zur ersten Lamelle eingedrungene Wasser aufgenommen. Jetzt entfernte man die Stopfen und saugte mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Kapillare die organische Phase möglichst vollständig ab. Die verbliebenen wenigen μ l wurden mit einem leichten Stickstoffstrom aus einer Kapillare weggeblasen. Ein gelegentlich beobachteter feiner Feuchtigkeitsfilm an der Wandung verschwand hierbei. Mit einer 100 μ l Spritze mit Volumendosiervorrichtung wurden dann 50 bzw. 25 μ l Toluol p. a. zugegeben. 25 μ l, wenn weniger als 200 ng Aminochinolin in der Probe erwartet wurden. Zuletzt tropfte man 0,5 ml 25-proz. Natronlauge zu und verschloß die Anreicherungsgläser mit den in Abb. 7 gezeigten Teflonkolben. Dazu wurde der Teflonkolben mit etwas herausgeschraubtem Kern langsam, ohne Drehen, etwa $1/3$ seiner Länge unbesehen in ein Glas hineingepreßt, zwar mit der notwendigen Kraft, aber langsam genug, damit die Teflonlamellen dem Druck nachgeben konnten; was besonders bei etwas unrunder Gläsern wichtig war. Zur genaueren Einstellung hielt man das Anreicherungsglas in Augenhöhe und schob den Kolben von oben mit der anderen Hand weiter. Bei richtiger Füllung berührte die Spitze des Kolbens gerade noch nicht die Flüssigkeitsoberfläche. Der Kern des Teflonkolbens wurde $1/4$ - $1/2$ Umdrehung über den ersten spürbaren Widerstand hinaus festgedreht. Nun verfuhr man wieder wie bei der Ausschüttelung mit Schwefelsäure, stellte die Anreicherungsgläser dann jedoch mit dem Hals nach oben in die Einsätze (Abb. 5) und zentrifugierte 5 Minuten

lang bei 2400 U/Min. ($\approx$ 2900 g). Die kleinen Teflonstopfen wurden dann zwar angehoben, mit Filtrierpapier evtl. aus dem Ultraschallbad eingedrungenes Wasser entfernt, aber erst zur Gas-Chromatographie abgenommen.

5.5. Analyse der Blutproben

5.5.1. Bedingungen für die Gas-Chromatographie

5.5.1.1. Trennsäulen

1. OV-17 - Säule: Länge 100 cm.
2,5 % OV-17 (Methyl-Phenyl-Silikongummi) auf Chromosorb W (AW-DMCS)
H.P., 80-100 mesh.
2. OV-1 - Säule: Länge 150 cm.
4 % OV-1 (Methyl-Silikongummi) auf Chromosorb W (AW-DMCS)
H.P., 80-100 mesh.
3. OV-101 - Säule: Länge 200 cm.
4 % OV-101 (Methyl-Silikongummi) auf Chromosorb W (AW-DMCS)
H.P., 80-100 mesh.
4. OV-1 - Säule: Länge 200 cm.
4 % OV-1 (Methyl-Silikongummi) auf Chromosorb W (AW-DMCS)
H.P., 80-100 mesh.

Die Trennsäulen waren so geformt, daß sie in einem Stück vom Einspritzgummi bis zum Detektoranschlußstück (Abb.9) reichten. Sie wurden unter Verwendung von jeweils 2 Silikongummiringen angeschlossen. Aus

der Tabelle 14 ist die für die Bestimmung der einzelnen Substanzen jeweils verwendete Trennsäule zu entnehmen.

Tabelle 14 :

Trennsäulen für die Bestimmung der einzelnen Aminochinoline

Trennsäulen	Aminochinoline
OV-17 - Säule: 100 cm	I II III V VII VIII IX X XI
OV-1 - Säule: 150 cm	IV VI XI XII
OV-1 - Säule: 200 cm	XII

5.5.1.2. Einstellungen am Gas-Chromatographen

Einspritzblocktemperatur: 285-290°; Detektortemperatur: 255-260°;
Detektorblocktemperatur : 315-320°.

Trennsäulen-Temperatur bei der Bestimmung der Aminochinoline auf verschiedenen Trennsäulen:

OV-17 - Säule: 100 cm		OV-1 - Säule: 150 cm		OV-1 - Säule 200 cm	
XI	242-246°	XII	248°	XII	260°
IX	250°	IV	260°		
II	250-252°	VI	268°		
X	250-255°		260°		
IV	255-260°		250°		
I	260°	XI	270°		
III	268°				
V	270°				
VIII	270°				
VIII	280°				

Gase:

Die Gasströme wurden mit einem Seifenfilm-Strömungsmesser über unmittelbar nach den Differentialdruckreglern in die Gasleitungen eingebaute T-Stücke gemessen.

Gase	OV-17-Säule: 150 cm	OV-1-Säule: 200 cm
Trägergas:	62 ml/Min. Helium Vordruck: 7,0 atü	63 ml/Min. Helium Vordruck: 7,0 atü
Wasserstoff:	24,8 - 24,9 ml/Min. Vordruck: 7,0 atü	24,8 - 24,9 ml/Min. Vordruck: 7,0 atü
Luft:	173 ml/Min. Vordruck: 4,4 atü	167 ml/Min. Vordruck: 4,4 atü

Elektrometereinstellung: Range 10^3 ; Papiervorschub: 0,5 inch/Min.;
Einspritzmenge: 1 - 2 μ l.

5.5.1.3. Einstellungen am Integrator

Noise Suppression: 2 ; Recorder Presentation: 20, (10, 1) mV for Full Scale ; Slope Sensitivity: up: 0,1 mV/min. und down: 0,3 mV/min.;
Baseline Reset Delay: 0 min.; Area Treshold: 100 ; Shoulder
Control: Front: off und Rear: 100 mV .

Mit Ausnahme von Noise Suppression in Stellung 2 und Range 10^3 am Elektrometer wurden die Parameter für den Integrator den Gegebenheiten der Analyse angepaßt. Bei schwierigen Analysen wurden, während mehrerer Einspritzungen, die einzelnen Parameter in Form von bis zu vier Programmen beliebig vorgewählt und während der endgültigen Analyse durch Tastendruck abgerufen.

5.5.1.4. Allgemeines zur gas-chromatographischen Apparatur

Detektorblock- und Detektorheizung wurden im Dauerbetrieb Tag und Nacht unverändert gelassen, bei größeren Pausen jedoch auf etwa 110° reduziert. Über Nacht wurde die Temperatur des Einspritzblockes und des Trennsäulenofens auf 150° zurückgenommen, der Trägergasstrom auf 8-10 ml/Min. reduziert und die Wasserstoff- und Luftzufuhr unterbrochen. Elektrometer, Schreiber und Integrator wurden nur bei Bedarf eingeschaltet.

5.5.2. Vorbereitung des Gas-Chromatographen zur Analyse

Etwa 30 Minuten vor einer Analyse schaltete man die Geräte ein, regelte die Gasströme und heizte den Einspritzblock und den Trennsäulenofen auf. Mit einem Glasfaserradierstift wurde die Oberfläche des Rubidumbromidkristalls gesäubert und die Flamme gezündet. Durch 9 halbe Umdrehungen der Spindel näherte man den Kollektor der Brennerdüse und ermittelte durch sehr vorsichtiges, weiteres Senken des Kollektors das Optimum der Ionisation, welches als maximale Schreiberauslenkung zu erkennen war. Jetzt wurde der Kollektor wieder in winzigen Schritten hochgedreht, bis die Verminderung der Ionisation 15-20 Einheiten am Zehngangpotentiometer der Nullabgleichung des Elektrometers ausmachte. Der Zeitaufwand betrug etwa 10 Minuten. Anschließend wartete man noch 10 Minuten, bis sich eine stabile Grundlinie eingestellt hatte. Bei Beginn einer Analyse überprüfte man mit einer Einspritzung der Probe mit dem höchsten Gehalt an Aminochinolin die Grundlinie nach dem Lösungsmittelpeak. Vor dem Substanzpeak durfte wegen der Arbeitsweise des Integrators keine ansteigende Drift der Grundlinie zu beobachten sein, andernfalls drehte man den Kollektor vorsichtig noch etwas höher. Nun war die gas-chromatographische Apparatur zur Analyse bereit.

5.5.3. Gas-chromatographische Bestimmung

5.5.3.1. Vorversuch

Die Toluolphasen der einzelnen Analysenproben, die man nach der Arbeitsvorschrift im Kapitel 5.4.3. erhielt, wurden in der Reihenfolge abnehmender Konzentration chromatographiert und integriert. Durch vorsichtiges Eintauchen eines feinen Schmelzpunktröhrchens wurden etwa 5-10 µl Toluolphase mit den angereicherten Aminoquinolinen aus dem Hals der Anreicherungsgläser entnommen. Die Schmelzpunktröhrchen wurden waagrecht in eine Halterung gelegt, welche aus zwei parallel verbundenen, oben eingekerbten Plexiglasplättchen bestand, und die Einspritzmenge in eine 10 µl Spritze aufgezogen, mit der man sie auf die Trennsäule brachte. Man wiederholte die Bestimmung 3-5 mal. Anschließend wurden 50 ng der zu bestimmenden Substanz in 1 µl Toluol, als äußerer Standard 5 mal eingespritzt und integriert.

5.5.3.2. Auswertung des Vorversuches

Die Blutspiegelwerte ließen sich nach folgender Formel errechnen:

$$\text{Blutspiegelwert (ng/ml)} = \frac{V_O \cdot V_T \cdot G_{St} \cdot F_E}{V_A \cdot V_E \cdot F_{St} \cdot V_{Bl}} \cdot \frac{100}{K}$$

V_O = ml n-Hexan Essigsäure-iso-amylester zur Extraktion der Analysenprobe,

V_A = Aliquot von V_O in ml,

V_T = µl Toluolphase,

V_E = eingespritzter Anteil von V_T in µl,

- F_E = Fläche des gesuchten Aminochinolins in V_E in $\mu Vsec$
 G_{St} = ng äußerer Standard,
 F_{St} = Fläche des äußeren Standards in $\mu Vsec$
 V_{Bl} = ml Blut der Analysenprobe,
 K = angenommene Wiederfindung: zwischen 70 % und 90 %.

Die Blutspiegelwerte wurden jeweils für eine Wiederfindung von 70 % und 90 % errechnet und im halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die Zeit aufgetragen, wobei auf der logarithmisch geteilten Ordinate die Blutspiegelwerte und auf der linear geteilten Abszisse die Zeitwerte aufgetragen wurden. Man verband die jeweiligen Grenzwerte für 70 % und 90 % Wiederfindung miteinander und zeichnete durch die erhaltenen Balken eine Gerade. Auf diese Weise erhielt man die orientierende Blutspiegelkurve.

5.5.3.3. Hauptversuch und Vergleichsanalysen

Die Toluolphasen der einzelnen Proben des Hauptversuches wurden im Wechsel mit den Toluolphasen der Vergleichsanalysen chromatographiert und zwar wiederum in der Reihenfolge abnehmender Konzentration an Aminochinolinen. Wie im Vorversuch wurden 1 - 2 μl eingespritzt.

5.5.3.4. Auswertung der Vergleichsanalysen

Der Korrekturfaktor nach Kapitel 3.5. für die zu bestimmende Substanz und den inneren Standard ließ sich nach folgender Formel errechnen:

$$RF = \frac{\text{ng Standard}}{\text{ng Substanz}} \times \frac{\text{Fläche der Substanz in } \mu Vsec}{\text{Fläche des Standards in } \mu Vsec}$$

Die für die einzelnen Vergleichsanalysen errechneten Korrekturfaktoren wurden im linearen Koordinatensystem gegen die Menge an Standard in der Vergleichsanalyse aufgetragen, wobei auf der Ordinate der Korrekturfaktor und auf der Abszisse die Standardmenge aufgetragen wurde. Die so erhaltene Korrekturfaktorkurve stellte den Gang des Korrekturfaktors mit der absoluten Menge dar. Sie war für die anschließende Auswertung des Hauptversuches notwendig.

5. 5. 3. 5. Auswertung des Hauptversuches

Die Blutspiegelwerte ließen sich nach folgender Formel errechnen:

$$\text{Blutspiegelwert (ng/ml)} = \frac{F_E \times G_{St}}{F_{St} \times V_{Bl} \times RF}$$

F_E = Fläche der gesuchten Substanz in $\mu Vsec$

F_{St} = Fläche des inneren Standards in $\mu Vsec$

G_{St} = ng innerer Standard

V_{Bl} = Blut der Analysenprobe

RF = Korrekturfaktor, aus der Korrekturfaktorkurve, entsprechend der Menge an innerem Standard in der Analysenprobe.

5. 5. 4. Blutspiegelkurve der gesuchten Substanz

Die endgültige Blutspiegelkurve erhielt man durch graphische Darstellung im halblogarithmischen Koordinatensystem. Die Blutspiegelwerte wurden auf der logarithmisch geteilten Ordinate mit 4 Dekaden, die Zeitwerte auf der linear geteilten Abszisse aufgetragen.

6. Weitere analytische und präparative
Versuchsbeschreibungen

6.1. Allgemeine Angaben:

Bei der Dünnschicht-Chromatographie wurde Kieselgel G nach Stahl der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet. Die Chromatogramme wurden in einer mit Filtrierpapier ausgekleideten Desaga - Trennkammer entwickelt. Die Angabe der Steighöhen erfolgte in Form der R_F - Werte = $R_F \times 100$ ¹⁰⁶⁾.

Zum Nachweis wurden die entwickelten Chromatogramme unter UV - Bestrahlung im Fluotest-Gerät "Original Hanau" der Quarzlampen GmbH, Hanau, betrachtet. Fluoreszierende Flecken wurden umrandet. Anschließend wurden die Platten mit einer 0,04-proz. Fluoreszein-Natrium-Lösung besprüht und erneut im UV-Licht betrachtet. Nicht fluoreszierende Flecken erschienen dabei als dunkle Flecken auf gelbgrün fluoreszierendem Untergrund.

Die Säulen-Chromatographie erfolgte an neutralem Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe I, der Firma M. WOELM, Eschwege, an Kieselgel unter 0,08 mm für die Säulen-Chromatographie der Firma E. MERCK AG, Darmstadt, an Polyamid 6 der Firma WOELM, Eschwege, und an MN-Polyamid-6-Ac (acetyliertes Polycaprolactam) für die Säulen-Chromatographie unter 0,16 mm der Firma MACHEREY-NAGEL & Co., Düren.

Als Celite wurde Celite 503 der JOHNS-MANVILLE Corp., New York, verwendet.

Für die präparative Schicht-Chromatographie auf Kieselgel PF_{254} wurden die Ränder von 20 x 20 Chromatographieplatten durch Aufkleben von schmalen Glasstreifen (7 mm x 3 mm) mit dem Kleber Uhu, hart, erhöht und so eine Gießform geschaffen. Für eine Schichtdicke von 2 mm wurden 80 ml einer Suspension von Kieselgel PF_{254} für die präpara-

tive Schicht-Chromatographie der Firma E. MERCK AG, Darmstadt, in 375 ml Wasser verwendet. Die beschichteten Platten wurden mindestens 20 Stunden an der Luft getrocknet und vor Gebrauch bei 120° aktiviert. Die Entwicklung erfolgte in einer mit Filtrierpapier ausgekleideten Desaga - Trennkammer.

Unter Vakuum (i. Vak.) ist das mit der Wasserstrahlpumpe erreichbare Vakuum zu verstehen. Zum Eindampfen i. Vak. wurde in der Regel ein BÜCHI - ROTAVAPOR R verwendet, dessen Wasserbadtemperatur wahlweise 30° - 90° betrug.

Die Titration der Basen in wasserfreiem Lösungsmittel wurde am Titri-graph, bestehend aus Titrator TTT 1c, Autobürette ABU 12 mit Abschirmsatz und Schreiber SBR 2c, der Firma RADIOMETER, Kopenhagen, durchgeführt. Titriert wurde mit 0,1 n Perchlorsäure-Lösung in wasserfreiem Dioxan.

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit dem 60 MHz-Gerät der Firma JEOL, Tokio, im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg aufgenommen. Als Lösungsmittel diente CDCl_3 , als innerer Standard TMS.

Die Massenspektren wurde mit dem CH-4-Gerät der Firma VARIAN-ATLAS im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg aufgenommen.

Für die Aufnahme und hilfreiche Diskussion der Spektren danke ich Herrn Dr. A. Haag und Herrn Univ.-Doz. Dr. K. Geibel.

Die Hydrierung unter Druck wurde in einer PARR-Apparatur der Firma PARR-INSTRUMENT-COMPANY, Inc., Moline, Illinois, USA, durchgeführt.

6.2. Bromierungen

Darstellung von 3-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin und 3.7-Dibrom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin

1,15 g (3 mMol) 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin wurden im verschlossenen 25 ml Rundkolben in 10 ml eisgekühltem 15-proz. Oleum unter kräftigem Rühren auf einem Magnetrührer in Lösung gebracht und mit einer eisgekühlten Lösung von 0,86 g (3 mMol) Dibromisocyanursäure ⁴⁵⁾ in 10 ml eisgekühltem 15-proz. Oleum versetzt und der Kolben sofort wieder verschlossen. Es wurde noch 30 Minuten im Eisbad gerührt und dann das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 300 g fein zerstoßenes Eis gegossen. Unter ständiger Kühlung mit Eisstückchen wurde die Lösung zuerst mit gekühlter konz. Natronlauge auf pH 5 abgestumpft und dann mit Soda neutralisiert. Bei pH 7-8 wurde dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 2n Sodalösung und einmal mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat i. Vak. bei 40° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol aufgenommen und über eine Säule mit Aluminiumoxid "neutral", 16 cm, 2 cm Ø, chromatographiert und mit Äther erschöpfend eluiert. Nach dem Eindampfen i. Vak. blieben 1,1 g hellbraunes Öl zurück. Im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (90 + 10) zeigten sich nach dem Besprühen mit 0,01-proz. äthanolischer Silbernitratlösung und anschließendem Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm) zwei grauschwarze Flecken mit hRf 34 und hRf 46.

Die beiden Bromderivate wurden mit Hilfe der präparativen Schicht-Chromatographie (PSC) getrennt. Das hellbraune Öl wurde in 10 ml Äther gelöst und auf drei PSC-Platten aufgetragen. Diese wurden zweimal in Benzol/Triäthylamin (90 + 10) entwickelt, wobei man das Fließmittel jeweils bis an den oberen Plattenrand steigen ließ. Nach der ersten Ent-

wicklung trocknete man die Platten i. Vak. bei 40° und stellte sie umgehend in die Trennkammer zurück. Nach der zweiten Entwicklung wurden die beiden fließmittel-feuchten, gelbgrünen bzw. blaßgrünen Substanzbänder mit einem Spatel nacheinander ausgekratzt und nach Zusatz einiger Tropfen Triäthylamin jeweils mit 3×50 ml Aceton auf einem Magnetrührer digeriert. Die Filtrate wurden i. Vak. eingedampft, der Rückstand zur Entfernung von restlichem Kieselgel in 20 ml Äther aufgenommen und auf ein hartes Filter gegeben. Es wurde wieder i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt zwei Öle, die im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (90 + 10) im UV-Licht und nach dem Besprühen mit 0,01-proz. äthanolischer Silbernitratlösung jeweils nur einen Fleck mit R_f 46 für das braune und R_f 34 für das grünlichbraune, zähflüssige Öl zeigten. Letzteres kristallisierte nach längerer Zeit.

Identifizierung:

Die Verbindung mit R_f 34 konnte als 3-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4.5.8-trimethoxy-chinaldin bestimmt werden.

Titration:

17,36 mg Substanz (in Acetonitril):

$C_{22}H_{34}BrN_3O_3$ (468,45)	1. Umschlagspunkt:	0,358 ml 0,1n $HClO_4$
	Ber.: Äquiv.-Gew.	468,5
	Gef.: Äquiv.-Gew.	484,9
	2. Umschlagspunkt:	0,719 ml 0,1n $HClO_4$
	Ber.: Äquiv.-Gew.	234,2
	Gef.: Äquiv.-Gew.	241

Massenspektrum: Das Molekülion (M^+) erscheint als Dublett bei m/e 467/469, d.h. ein Bromatom im Molekül.

Kernresonanzspektrum: Zuordnung des Brom-Substituenten in 3-Stellung.
Spektrum s. Kap. 3.2.2.

Die Verbindung mit hRf 46 konnte als 3,7-Dibrom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin bestimmt werden.

Titration:

24,2 mg Substanz (in Acetanhydrid):

$C_{22}H_{33}Br_2N_3O_3$ (547,37)	1. Umschlagspunkt:	0,440 ml 0,1n $HClO_4$
	Ber.:	Äquiv. -Gew. 547,4
	Gef.:	Äquiv. -Gew. 548
	2. Umschlagspunkt:	0,877 ml 0,1n $HClO_4$
	Ber.:	Äquiv. -Gew. 273,7
	Gef.:	Äquiv. -Gew. 276
	3. Umschlagspunkt:	1,302 ml 0,1n $HClO_4$
	Ber.:	Äquiv. -Gew. 182,7
	Gef.:	Äquiv. -Gew. 186

Massenspektrum: Das Moleküllion (M^+) erscheint als Dublett bei m/e 545/549, d.h. zwei Bromatome im Molekül.

Kernresonanzspektrum: Zuordnung der Brom-Substituenten in 3- und 7-Stellung. Spektrum s. Kap. 3.2.2.

Darstellung von 7-Brom-6-(4-diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin

1,12 g (3 mMol) 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin wurden im verschlossenen 25 ml Rundkolben in 10 ml 15-proz. Oleum gelöst, im Eisbad gekühlt und in einem Guß mit einer eisgekühlten Lösung von 0,86 g (3 mMol) Dibromisocyanursäure ⁴⁵⁾ in 10 ml 15-proz. Oleum versetzt. Im dichtverschlossenen Kolben wurde zwei Stunden lang auf einem Magnetprüher im Eisbad

gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann unter Rühren auf 300 g feinstoßenes Eis gegossen, tropfenweise mit gekühlter konz. Natronlauge abgestumpft, mit 2n Sodalösung auf pH 7-8 gebracht und dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 2n Sodalösung und einmal mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat i. Vak. bei 40° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol aufgenommen, über eine Säule mit Aluminiumoxid "neutral", 40 cm, 2 cm ϕ , chromatographiert und mit Benzol erschöpfend eluiert. Nach dem Eindampfen i. Vak. blieben 800 mg gelbgrünes Öl zurück. Das Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (90 + 10) zeigte im UV-Licht einen Fleck mit R_f 75 und darüber zwei kleinere fluoreszierende Flecken. Nach dem Besprühen mit 0,01-proz. Silbernitratlösung und Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm) wurde der Fleck des Bromierungsproduktes mit R_f 75 schwarz. Mit Hilfe der präparativen Schicht-Chromatographie wurde das Bromderivat rein gewonnen. Das gelbgrüne Öl wurde in wenig Benzol gelöst und auf 3 PSC-Platten aufgetragen. Diese wurden mehrmals in Aceton entwickelt, um die beiden Fluoreszenzbänder an den oberen Plattenrand zu bringen. Anschließend wurde mehrmals in Benzol/Triäthylamin (98 + 2) entwickelt. Nach jedem Entwickeln wurden die Platten i. Vak. bei 40° getrocknet und umgehend in die Trennkammer zurückgestellt. Nach dem Auskratzen der noch fließmittel-feuchten, reinen Zone wurde das Kieselgel dreimal mit 50 ml Aceton auf einem Magnetrührer digeriert. Die Filtrate wurden i. Vak. eingedampft, der Rückstand zur Entfernung von restlichem Kieselgel in 20 ml Äther aufgenommen und auf ein hartes Filter gegeben. Es wurde wieder i. Vak. eingedampft und der Rückstand i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt 400 mg eines bernsteinfarbenen, zähflüssigen Öles (30 % d. Th.). Im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (90 + 10) zeigte sich ein Fleck mit R_f 75, gegenüber der Ausgangsverbindung mit R_f 56.

Identifizierung:

Titration:

17,78 mg Substanz (in Acetanhydrid):

$C_{22}H_{34}BrN_3O_2$ (452,44)	1. Umschlagspunkt: 0,383 ml 0.1n $HClO_4$
	Ber.: Äquiv.-Gew. 452,44
	Gef.: Äquiv.-Gew. 458
	2. Umschlagspunkt: 0,774 ml 0.1n $HClO_4$
	Ber.: Äquiv.-Gew. 226,2
	Gef.: Äquiv.-Gew. 228
	3. Umschlagspunkt: 1,164 ml 0.1n $HClO_4$
	Ber.: Äquiv.-Gew. 150,8
	Gef.: Äquiv.-Gew. 152

Kernresonanzspektrum: Zuordnung des Brom-Substituenten in 7-Stellung.
Spektrum s. Kap. 3.2.2.

Darstellung von 3-Brom-6-amino-4.5.8-trimethoxy-chinaldin
und 3.7-Dibrom-6-amino-4.5.8-trimethoxy-chinaldin

1,24 g (5 mMol) 6-Amino-4.5.8-trimethoxy-chinaldin wurden im verschlossenen 25 ml Rundkolben in 10 ml eisgekühltem 15-proz. Oleum gelöst und mit der eisgekühlten Lösung von 1,43 g Dibromisocyanursäure⁴⁵⁾ in 10 ml 15-proz. Oleum versetzt. Im dichtverschlossenen Kolben wurde 30 Minuten lang im Eisbad auf einem Magnetrührer gerührt und dann das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 300 g feinerstoßenes Eis gegossen. Unter ständiger Kühlung mit Eisstückchen wurde die Lösung zuerst mit gekühlter konz. Natronlauge auf pH 5 abgestumpft und dann

mit Soda auf pH 7-8 gebracht. Es wurde dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten, zweimal mit 2n Sodalösung und einmal mit Wasser gewaschenen organischen Phasen wurden nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat i. Vak. bei 40° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol aufgenommen und über eine Säule mit Aluminiumoxid "neutral", 16 cm, 2 cm ϕ , chromatographiert und mit Äther erschöpfend eluiert. Nach dem Eindampfen blieb ein braunes Öl zurück. Im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (90 + 10) konnten nach dem Besprühen mit 0,01-proz. äthanolischer Silbernitratlösung und Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm) drei bromhaltige Substanzflecken mit hRf 20, hRf 30 und hRf 50 nachgewiesen werden. Die beiden Bromderivate mit hRf 20 und hRf 50 konnten mit Hilfe der präparativen Schicht-Chromatographie gereinigt und isoliert werden. Die Substanz mit hRf 30 wurde nicht isoliert, da sie in zu geringer Menge vorlag. Der braune Rückstand wurde in wenig Benzol gelöst und auf drei PSC-Platten aufgetragen. Diese wurden zweimal in Benzol/Triäthylamin (90 + 10) entwickelt. Nach der ersten Entwicklung trocknete man die Schicht i. Vak. bei 40° und stellte sie umgehend in die Trennkammer zurück. Nach der zweiten Entwicklung wurden die beiden noch fließmittel-feuchten Substanzbänder mit einem Spatel nacheinander ausgekratzt. Die beiden Kieselgelmengen wurden jeweils dreimal mit 50 ml Aceton auf einem Magnetrührer digeriert und die Filtrate i. Vak. eingedampft. Den Rückstand nahm man in 20 ml Äther auf und gab die Lösung auf ein hartes Filter. Das Filtrat wurde wieder i. Vak. eingedampft und der Rückstand über Phosphorpentoxid i. Vak. getrocknet. Man erhielt zwei Öle, die nach einiger Zeit mit grünlichbrauner Farbe kristallisierten.

Identifizierung:

Kernresonanzspektren: Die Verbindung mit hRf 20 wurde als 3-Brom-6-amino-4,5,8-trimethoxy-chinaldin und die mit hRf 50 als 3,7-Dibrom-6-amino-4,5,8-trimethoxy-chinaldin erkannt. Spektren s. Kap. 3.2.2.

6.2.1. Bromierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-
4,5,8-trimethoxy-chinaldin im Mikrogramm-Bereich

In eine 2 ml Ampulle wurden 50-100 µl einer Lösung der Verbindung VII in Hexan zu 100 µl konz. Schwefelsäure oder 15-proz. Oleum gegeben und 1 - 2 Minuten auf einem Magnetrührer kräftig gerührt. Als Rührer wurde ein 4 mm langer, in Glas eingeschmolzener Drahtstift verwendet. Anschließend wurde im Stickstoffstrom das Lösungsmittel vertrieben. Nach Zugabe von 50-10 µl einer Lösung von 1 µg/µl Dibromisocyanursäure ⁴⁵⁾ in 15-proz. Oleum wurde langsam 15-30 Minuten lang gerührt, dann die Reaktionsmischung in Eis gekühlt, mit einer Kapillarpipette vorsichtig mit Eiswasser auf das doppelte Volumen verdünnt und mit eisgekühlter 4n Natronlauge neutralisiert. Es durfte keine starke Erwärmung auftreten. Mit 50-100 µl Benzol wurde extrahiert und wenn notwendig zentrifugiert.

6.3. Derivatisierungen

6.3.1. Derivatisierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin mit Trifluoressigsäureanhydrid

Zu einer Lösung von 10-50 ng der Verbindung VII in 50 µl Essigsäure-äthylester (Benzol) wurden 50 µl Trifluoressigsäureanhydrid gegeben und im dicht verschlossenen Reagenzglas 60-120 Minuten lang auf 30-50° erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde dann, entweder bei 50° im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 50-100 µl Benzol aufgenommen, oder nach Zugabe von Natriumhydrogenkarbonat-Lösung geschüttelt und zentrifugiert.

6.3.2. Derivatisierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-4,5,8-trimethoxy-chinaldin mit Heptafluorbuttersäureanhydrid

Zu einer Lösung von 50 ng der Verbindung VII in 50 µl Benzol mit einem Gehalt von etwa 0,5 % Triäthylamin wurden 20 µl Heptafluorbuttersäureanhydrid gegeben und im dichtverschlossenen Reagenzglas 30-60 Minuten lang auf 50° erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde dann entweder mit einem Stickstoffstrom bei 80° zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 50 µl Benzol aufgenommen oder nach Zugabe von Natriumhydrogenkarbonat-Lösung geschüttelt und zentrifugiert.

6.4. Entmethylierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin

280 mg (0,75 mMol) 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin wurden in einer Quickfit-Mikroapparatur

mit 5 ml (0,45 Mol) 48-proz. Bromwasserstoffsäure unter Rühren auf einem Magnetrührer zum schwachen Sieden erhitzt. Nach zwei Stunden war im Dünnschicht-Chromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr zu erkennen und der ausgefallene Niederschlag wurde von einem tiefroten Filtrat abgenuzt. Diese ockergelben Nadeln waren in Äther, Alkohol und Wasser nahezu unlöslich, lösten sich aber unter Einschütteln von Luft in Sodälösung, wobei sich die Farbe von gelbgrün nach rötlichbraun änderte; die entstandene ockergelbe Substanz ließ sich bei keinem pH-Wert mehr mit Chloroform ausschütteln.

Das tiefrote Filtrat wurde mit Natriumhydrogenkarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt, im Ultraschallbad fünf Minuten lang kräftig Luft eingeschüttelt und mit Benzol erschöpfend extrahiert. Aus dem Benzolextrakt wurde in eine Phosphatpuffer-Lösung von pH 7,4 und zurück in Methylenchlorid geschüttelt. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wurde i. Vak. eingedampft. Der Rückstand, ein ziegelrotes zur Kristallisation neigendes, zähflüssiges Öl, zeigte im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem basischen Fließmittel Benzol/Diäthylamin (90 + 10) nur einen Fleck mit R_f 59, im Fließmittel Chloroform/Methanol (75 + 25) dagegen zwei Flecken mit R_f 53 und R_f 28. Die Trennung auf Aluminiumoxidsäulen war nicht möglich. Die Chromatographie über eine Säule, 25 cm, 2,2 cm ϕ , mit Kieselgel erbrachte mit Methylenchlorid/Methanol (98+2) als Elutionsmittel eine orangerote Hauptfraktion mit den beiden Flecken R_f 53 und R_f 28 und eine nur noch wenig Substanz enthaltende letzte Fraktion mit R_f 28. Bei der Chromatographie über eine Säule, 40 cm, 2,2 cm ϕ , mit Polyamid 6 und Wasser als Elutionsmittel wurde eine Fraktion erhalten, welche den pH-Wert 6,5 - 7,0 zeigte und der Substanz mit R_f 28 zukam, und eine Fraktion mit pH 10 entsprechend R_f 53. Nach einem Tag enthielten die zwei Fraktionen jeweils wieder die beiden Flecken mit R_f 28 und R_f 53 im Dünnschicht-Chromatogramm. Die Chromatographie schließlich über eine Säule mit acetyliertem Polyamid-6-Ac brachte nur eine Anreicherung der Substanz mit R_f 28 in der er-

sten Fraktion und mit hRf 53 in der letzten Fraktion.

Dieses Gemisch ergab im Gas-Chromatogramm mit einer 150 cm langen Trennsäule mit 4 % OV-1 bei 225° am NsFID nicht aufgetrennte Peaks von wechselnder Intensität. Nach Überführung in die Silylderivate mit N.O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid wurden zwei Hauptpeaks mit $t_S = 2,96$ Min. und $t_S = 10,51$ Min. erhalten.

6. 5. Extraktion von Urin, Exkrementen, Blut und Leber von Mäusen zum Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolinchinon

Urin:

In einen 25 ml Scheidetrichter der Quickfit-Mikroapparatur wurde 1 ml 0,2-proz. Schwefelsäure vorgelegt. Durch Ausstreifen der Blase in halbstündigem Abstand sammelte man über einen Trichter den Urin in der Vorlage. Mit Phosphatpuffer-Lösung von pH 6,5 wurde der Urin auf pH 5,25²⁷ gebracht (Einstabelelektrode) und mit 5 und 3 ml Methylenchlorid je-
weils zwei Minuten lang geschüttelt. Die organischen Phasen ließ man in einen zweiten Scheidetrichter ablaufen und wusch mit 1,5 ml 0,05-proz. Schwefelsäure; die wässrige Phase zeigte pH 2,4. Die i. Vak. bei 37-38° Badtemperatur im 8 ml Reagenzglas mit Schliff und spitzem Boden eingedampfte organische Phase ergab einen unsichtbaren Rückstand, der in 200 µl Toluol aufgenommen und gas-chromatographisch untersucht wurde. Wässrige Phase und Urin wurden vereint bei pH 6,8 erneut mit Methylenchlorid extrahiert. Sie enthielten nur die unverändert ausgeschiedene Verbindung VI.

Exkremente:

Die Exkremente wurden 24 Stunden lang in einer Vorlage von 150 ml 0,2-proz. Schwefelsäure gesammelt, in einen 1 l Rundkolben gespült,

mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogenkarbonat-Lösung versetzt und 50 Minuten lang mit 100 ml Methylenchlorid auf einer Maschine geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Phasen im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase mit zweimal 20 ml Phosphatpuffer-Lösung von pH 7,4 gewaschen, i. Vak. auf 20 ml eingengt und mit zweimal 20 ml 2n Schwefelsäure ausgeschüttelt. Diese schwefelsaure Phase wurde einmal mit 10 ml Methylenchlorid gewaschen und nach Zugabe von 35 ml Methylenchlorid unter ständigem Schütteln mit Natriumkarbonat alkalisch gemacht. Mit 5 ml Methylenchlorid wurde dann noch einmal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nach dem Waschen mit 10 ml Phosphatpuffer-Lösung von pH 7,4 i. Vak. eingedampft und der Rückstand für die gas-chromatographische Untersuchung in 200 µl Toluol aufgenommen.

Leber:

Fünf tiefgefrorene Lebern wurden mit 4,5 ml 0,9-proz. Kochsalzlösung bei einer Drehzahl von 800 U/Min. zwei Minuten lang im Tissue-Grinder mit Teflonkolben homogenisiert. Die Suspension wurde mit 0,9-proz. Kochsalzlösung auf 100 ml ergänzt und nach Zusatz von 20 ml gesättigter Natriumhydrogenkarbonat-Lösung mit 100 ml Methylenchlorid 50 Minuten lang auf einer Maschine geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren bei 3000 g wurde nur sehr wenig organische Phase erhalten. Die restliche organische Phase wurde durch Rühren der verbliebenen Gallerte in einer Trockeneis/Aceton-Mischung freigesetzt und im Scheidetrichter abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde noch einmal mit 50 ml Methylenchlorid extrahiert. Die organischen Phasen wurden i. Vak. auf 3 ml eingengt und mit zweimal 5 ml 0,2-proz. Schwefelsäure extrahiert. Diese saure Phase wurde mit Natriumhydrogenkarbonat alkalisch gemacht und mit zweimal 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Diese organischen Phasen wurden i. Vak. eingedampft und der Rückstand für die gas-chromatographische Untersuchung in 200 µl Toluol aufgenommen.

Blut:

5 ml Blut, in 3 ml Heparinlösung aufgefangen, wurden mit 3 ml 0,4 m Boratpuffer-Lösung von pH 9,25 versetzt und mit zweimal 10 ml Toluol extrahiert. Die organische Phase wurde auf 200 μ l i. Vak. eingengt und gas-chromatographisch untersucht.

6.6. Bildung der Pyrido- [3,2-a] -phenazin - Derivate von 5,6-Chinolinchinonen im Nanogramm - Bereich

Die Lösung eines 5,6-Chinolinchinons in 50-200 μ l Toluol wurde mit zwei Tropfen Eisessig und einigen Kriställchen o-Phenylendiamin versetzt und fünf Minuten lang im Wasserbad von 80-90° erwärmt. Die Reaktionslösung färbte sich dabei schwach gelbgrün. Nach Neutralisation mit gesättigter Natriumhydrogenkarbonat-Lösung wurde geschüttelt und zentrifugiert. Die organische Phase konnte direkt für die gas-chromatographische Untersuchung verwendet werden.

6.7. Oxydation von Aminoquinolinen mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

Die Bestimmung des pK_S -Wertes und die Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat (III) erfolgte auf dem Mikrotitrationsstand TTA 31 am Titrigraphen mit der Mikrobürette B 230 (0,25 ml), der Kalomelelektrode K 4112 und der Glaselektrode G 2222 C im Titrierbecher V 516.

6.7.1. Bestimmung des pK_S - Wertes

0,01 mMol der Verbindung wurden im Titrierbecher in 2 ml 0,3 m Kaliumchlorid-Lösung und 1 ml Wasser gelöst und nach Zusatz von 1 Tropfen 0,1 n HCl mit 0,1 n KOH titriert. Vor der Titration wurde das pH-Meter

mit zwei Phosphatpuffer-Lösungen von pH 5,6 und 7,1 geeicht. Papiervorschub 2 cm/Min.; Schreiber-Eichung 0,5 pH/Min.; Proportionalband 0,1 .

6.7.2. Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat (III) - Lösung

0,015 mMol der Verbindung wurden in 2 ml Wasser gelöst und mit 1-2 Tropfen 0.1 n HCl auf einen pH-Wert von etwa 2,5 Einheiten unter dem pK_S -Wert gebracht. Nach Zugabe von 2 ml einer Lösung aus 0,1 m Kaliumhexacyanoferrat (III)- und (II)-Lösung (8 + 2) ließ man soviel 0.1 n KOH aus der Bürette zulaufen, bis der am Gerät eingestellte Titrationsendpunkt von 1,5 Einheiten unter dem pK_S -Wert erreicht war. Bei diesem pH-Wert wurde die Oxydation durch pH-Stat-Titration verfolgt. Die Auswertung der vom Schreiber aufgezeichneten Kurve erfolgte durch Ermittlung der Zeit, in der 10 % der theoretischen Menge an Kalilauge durch die Oxydation verbraucht wurden.

Papiervorschub 1 cm/8 Min.; Proportionalband 0,1; pH-Stat.

6. 8. Darstellung von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin (Plasmochin^(R) - Base)

1,7 g (10 mMol) 8-Amino-6-methoxy-chinolin, 4,6 g (20 mMol) 1-Diäthylamino-4,4-diäthoxy-pentan und 100 mg Ammoniumchlorid wurden im weiten Reagenzglas im Paraffinbad rasch erhitzt. Nach 3 Minuten begann das Gemisch ab 145° stark zu schäumen. Unter Rühren mit dem Thermometer blieb die Reaktionstemperatur 20 Minuten lang bei 145-150°, das Paraffinbad erhitzte sich dabei auf 180°. Innerhalb weiterer 5 Minuten wurde die Innentemperatur auf 180° gebracht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das entstandene, dunkle, braunrote, zähflüssige Öl in 100 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 100 mg Platinoxid in einer Parr-Hydrier-Apparatur bei 5 at. und 20° hydriert. Nach 6 Stunden waren 320 ml (14,5 mMol) Wasserstoff aufgenommen. Der Ansatz wurde über Celite abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft und der braune, ölige Rückstand mit 80 ml Wasser geschüttelt. Der Emulsion setzte man 20 ml 2n Salzsäure zu und extrahierte mit zweimal 50 ml Benzol. Nach Zusatz von Ammoniak bis pH 2 wurde nochmals mit 100 ml Benzol extrahiert. Die Benzolphasen wurden verworfen, die wäßrige Phase mit Natriumhydrogenkarbonat neutralisiert und viermal mit 50 ml Benzol extrahiert. Die vereinigten Benzolphasen wurden nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat i. Vak. eingedampft. Der Rückstand, ein braunes Öl, wurde in 25 ml Cyclohexan aufgenommen und die trübe Lösung über eine Säule, 15 cm, 2 cm Ø. mit Aluminiumoxid "neutral" chromatographiert. Es wurde mit Cyclohexan erschöpfend eluiert. Das i. Vak. eingedampfte Eluat ergab ein öliges Produkt. Im Dünnschicht-Chromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Cyclohexan/Triäthylamin (45 + 45 + 10) zeigten sich für das Produkt drei schwach gelbgrün fluoreszierende Flecke mit hRf 43, hRf 36 und hRf 25, wobei der Fleck mit hRf 36 den Hauptfleck darstellte. Nach dem Besprühen mit diazotierter Sulfanilsäure in 2n Sodalösung zeigten sich kräftig

orange gefärbte Flecke. Im Gas-Chromatogramm des Produktes, mit einer 200 cm langen Trennsäule mit 4 % OV-1 bei 260°, zeigten sich neben dem Hauptpeak mit einer Retentionszeit von $t_S = 0,97$ Min. drei weitere kleinere Peaks mit $t_S = 0,85$ Min., $t_S = 0,59$ Min. und $t_S = 1,05$ Min.. Die beiden Peaks mit $t_S = 0,97$ Min. und $t_S = 0,85$ Min. entsprachen denen, die aus einer Plasmochin^(R)-Injektionslösung der Fa. BAYER erhalten wurden. Mit Hilfe der präparativen Schicht-Chromatographie wurde die gewünschte Verbindung rein gewonnen. Das ölige Produkt wurde in wenig Benzol aufgenommen und auf drei PSC-Platten aufgetragen. Diese wurden zweimal in Benzol/Cyclohexan/Triäthylamin (50 + 50 + 10) entwickelt, wobei man das Fließmittel jeweils bis an den oberen Plattenrand steigen ließ. Nach der ersten Entwicklung trocknete man die Platten i. Vak. bei 40° und stellte sie umgehend in die Trennkammer zurück. Dann wurde das noch fließmittel-feuchte Substanzband mit einem Spatel ausgekratzt und mit dreimal 50 ml Aceton auf einem Magnetrührer digeriert. Die Filtrate wurden i. Vak. eingedampft, der Rückstand in wenig Benzol aufgenommen, auf eine PSC-Platte aufgetragen und nochmals gereinigt. Die Filtrate wurden wieder i. Vak. eingedampft, der Rückstand zur Entfernung von restlichem Kieselgel in 20 ml Cyclohexan aufgenommen und auf ein hartes Filter gegeben. Das Filtrat wurde wieder i. Vak. eingedampft und der Rückstand i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt 595 mg (18,9 % d. Th.) eines hellbraunen gas-chromatographisch mit FID und NsFID reinen Öles, das im Dünnschicht-Chromatogramm einen Fleck mit R_f 36 zeigte.

8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin-naphthalin-1,5-disulfonat

316 mg (1 mMol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-

chinolin wurden in 5 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung von 360 mg (1 mMol) Naphthalin-1.5-disulfonsäure $\cdot$ 4H₂O in 5 ml Methanol versetzt. Zur roten Salzlösung wurde in der Wärme bis zur beginnenden Trübung tropfenweise Aceton zugesetzt. Die Lösung wurde im Kühlschrank der Kristallisation überlassen. Die ausgefallenen gelborangen Kristallplättchen wurden abgenutscht, mit Aceton gewaschen und i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 551,6 mg (91,4 % d. Th.) Salz erhalten, das für die gas-chromatographische Bestimmung der Aminochinoline als innerer Standard verwendet wurde.

Basengehalt: 52,2 %.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALVING, A.S., L. EICHELBERGER, B. CRAIGE, R. JONES,
C.M. WHORTON, T.N. PULLMAN,
J. clin. Invest. 27, Suppl., 60 (1948)
- 2) AUE, W.A., C.W. GEHRKE, R.C. TINDLE, D.L. STALLING,
C.D. RUYLE,
J. Gas Chromatogr. 5, 381 (1967)
- 3) AVERILL, W.;
Instrument News 20(3), 12 (1970)
- 4) BARNICKEL, H.,
Dissertation, Erlangen 1968
- 5) BECKETT, A.H., G.R. WILKINSON,
J. Pharmacy Pharmacol. 17, Suppl., 104 (1965)
- 6) BERLINER, R.W., D.P. EARLE, J.V. TAGGART,
C.G. ZUBROD, W.J. WELCH, N.J. CONAN,
E. BAUMAN, S.T. SCUDDER, J.A. SHANNON,
J. clin. Invest. 27, Suppl., 98 (1948)
- 7) BLANCHARD, K.C.,
A Hypothesis for the Mechanism of 8-Aminoquinolines,
in: F.Y. Wiselogle, A Survey of Antimalarial Drugs
1941 - 1945, S.129,
J.W. Edwards, Ann Arbor, Michigan, 1946
- 8) BOGNAR, A.,
Hewlett-Packard Applikationsbericht G 007
- 9) BRODIE, B.B., S. UDENFRIEND, J.E. BAER,
J. biol. Chemistry 168, 299 (1947)

- 10) BRODIE, B.B., S. UDENFRIEND, W. DILL, G. DOWNING,
J. biol. Chemistry 168, 311 (1947)
 - 11) BRODIE, B.B., S. UDENFRIEND, W. DILL, T. CHENKIN,
J. biol. Chemistry 168, 319 (1947)
 - 12) BRODIE, B.B., S. UDENFRIEND, J.V. TAGGART,
J. biol. Chemistry 168, 327 (1947)
 - 13) BRODIE, B.B., S. UDENFRIEND,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 845 (1950)
 - 14) BRUCE, R.B., J.E. PITTS, F.M. PINCHBECK,
Analytic. Chem. 40, 1246 (1968)
 - 15) BRUCE, R.B., W.R. MAYNARD,
Analytic. Chem. 41, 977 (1969)
 - 16) CAMPBELL, D.B.,
J. Chromatogr. 49, 442 (1970)
 - 17) CASTAGNOU, R., M. SYLVESTRE,
Bull. Trav. Soc. Pharmac. Bordeaux 105, 121 (1966)
ref. C.A. 67, 62821 (1967)
 - 18) CIEPLINSKI, E.W.,
Analytic. Chem. 38, 928 (1966)
 - 19) CLARKE, D.D., S. WILK, S.E. GITLOW,
J. Gas Chromatogr. 4, 310 (1966)
 - 20) COATNEY, G.R., W.C. COOPER, N.B. EDDY, J. GREENBERG,
Survey of Antimalarial Agents,
Public Health Monograph No. 9,
Public Health Serv. Publ. No. 193,
U.S. Governm. Print. Off., Washington 1953
- a) S. 47 .

- 21) CURRIE, L.A.,
Analytic. Chem. 40, 586 (1968)
- 22) CURRY, S.H.,
Analytic. Chem. 40, 1251 (1968)
- 23) CURRY, S.H., G.P. MOULD,
J. Pharmacy Pharmacol. 21, 674 (1969)
- 24) DONIKE, M.,
Sportarzt und Sportmedizin 21, 27 (1970)
- 25) DONIKE, M., L. JAENICKE, D. STRATMANN, W. HOLLMANN,
J. Chromatogr. 52, 237 (1970)
- 26) DOST, F.H.,
Grundlagen der Pharmakokinetik, 2. Aufl.,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968
- 27) DRAKE, N.L., H.J. CREECH, D. DRAPER, J.A. GARMAN,
S. HAYWOOD, R.M. PECK, E. WALTON,
J. O'NEILL VAN HOOK,
J. Amer. chem. Soc. 68, 1214 (1946)
- 28) DRAKE, N.L., Y.T. PRATT,
J. Amer. chem. Soc. 73, 544 (1951)
- 29) DRAKE, N.L., Y.T. PRATT,
J. Amer. chem. Soc. 73, 544 (1951)
- 30) DUBOST, P., M. ALLINNE,
Bull. Sci. pharmacol. 46, 367 (1939)
ref. C.A. 34, 1700 (1940)
- 31) EISENBRAND, J.,
Fluorometrie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.,
Stuttgart 1966

- 32) EHRHART, G., R. RUSCHIG,
Arzneimittel, Bd. 2,
Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr., 1968
- 33) ELDERFIELD, R.C., L.L. SMITH,
J. Amer. chem. Soc. 75, 1022 (1953)
- 34) ELSLAGER, E.F., M.P. HUTT, L.M. WERBEL,
J. Heterocycl. Chem. 6, 99 (1969)
- 35) ENSOR, E.M.,
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg. 60, 75 (1966)
- 36) ERVIK, M., T. WALLE, H. EHRSSON,
Acta Pharm. Suecica 7, 625 (1970)
- 37) FAURAN, F., G. CÉSAIRE, C. PELLISSIER, J. GOUDOTE,
Ann. pharmac. franc. 28, 667 (1970)
- 38) FINK, E.,
Privatmitteilung
- 39) FINK, E., P. NICKEL, O. DANN,
Arzneim.-Forsch. (Drug. Res.) 20, 1775 (1970)
- 40) FOURNEL, J.,
Ann. pharmac. franc. 24, 133 (1966)
ref. C.A. 65, 5851 h (1966)
- 41) FUHRMANN, G.,
Z. Tropenmed. Parasitol. 2, 279 (1950)
- 42) FUHRMANN, G.,
Z. Tropenmed. Parasitol. 12, 152 (1961)
- 43) GAUDETTE, L.E., G.R. COATNEY,
Amer. J. trop. Med. Hyg. 10, 321 (1961)
- 44) GOTTARDI, W.,
Mh. Chem. 98, 507 (1967)

- 45) GOTTARDI, W.,
Mh. Chem. 99, 815 (1968)
- 46) GOTTARDI, W.,
Mh. Chem. 100, 42 (1969)
- 47) GREENBERG, J., D.J. TAYLOR, E.S. JOSEPHSON,
J. infect. Diseases 88, 163 (1951)
- 48) HAMMER, W.M., B.B. BRODIE,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 157, 503 (1967)
- 49) HARTMANN, C.H.,
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1, 159 (1966)
- 50) HETTICHE, H.,
Dissertation, Erlangen 1972
a) Für die Nachprüfung der Werte danke ich Herrn Hettche
- 51) HÖLZEL, W.-R.,
Dissertation, Erlangen 1971
- 52) HOLTZMAN, J.L.,
Anal. Biochem. 13, 66 (1965)
- 53) HUGHES, H.B., L.H. SCHMIDT,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 581 (1950)
- 54) IRVIN, J.L., E.M. IRVIN,
J. biol. Chemistry 174, 589 (1948)
- 55) JAIN, N.C., C.R. FONTAN, P.L. KIRK,
Microchem. J. 8, 28 (1964)
- 56) JAIN, N.C.,
Thesis, Berkeley 1965
- 57) JENTZSCH, D., E. OTTE,
Detektoren in der Gas-Chromatographie,
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. Main 1970

- 58) JOSEPHSON, E.S., J. GREENBERG, D.J. TAYLOR,
H.L. BAMl,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 103, 7 (1951)
- 59) JOSEPHSON, E.S., D.J. TAYLOR, J. GREENBERG,
A.P. RAY,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 76, 700 (1951)
- 60) KAISER, R.,
Chromatographie in der Gasphase, 2. Auflage, Bd. III/2,
Bibliographisches Institut, Mannheim/Zürich 1969
- 61) KAISER, R.,
Chromatographie in der Gasphase, Bd. IV,
Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
- 62) KAISER, R.,
Chromatographie in der Gasphase, 2. Auflage, Bd. III/1,
Bibliographisches Institut, Mannheim/Zürich 1969
- 63) KARMEN, A.,
Analytic. Chem. 36, 1416 (1964)
- 64) KARMEN, A., L. GIUFFRIDA,
Nature (London) 201, 1204 (1964)
- 65) KAZYAK, L., E.E. HRAST,
J. Gas Chromatogr. 6, 567 (1968)
- 66) KAZYAK, L., E.C. KNOBLOCK,
Analytic. Chem. 35, 1448 (1963)
- 67) KURODA, K.,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 137, 156 (1962)
- 68) LANDOWNE, R.A., S.R. LIPSKY,
Analytic. Chem. 35, 532 (1963)

- 69) LEIBNITZ, E., H.G. STRUPPE,
Handbuch der Gas-Chromatographie, 2.Auflage, S.178,
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1970
- 70) MACOMBER, P.B., R.L. O'BRIEN, F.E. HAHN,
Science (New York) 152, 1374 (1966)
- 71) Mc CHESNEY, E.W., J.P. Mc AULIFF, A.R. SURREY,
A.J. OLIVET,
Fed. Proc., Fed. Amer. Soc., Exp. Biol. 13, 97 (1954)
zitiert nach ROBINSON, A.E., A.I. COFFER,
F.E. CAMPS,
J. Pharmacy Pharmacol. 22, 700 (1970)
- 72) Mc CHESNEY, E.W., H.S. WYZAN, J.P. Mc AULIFF,
J. Amer. pharmac. Assoc. 45, 640 (1956)
- 73) Mc CHESNEY, E.W., W.F. BANKS, J.P. Mc AULIFF,
Antibiot. Chemotherapy 12, 583 (1962)
- 74) Mc CHESNEY, E.W., W.D. CONWAY, W.F. BANKS,
J.E. ROGERS, J.M. SHEKOSKY,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 151, 482 (1966)
- 75) Mc CHESNEY, E.W., M.J. FASCO, W.F. BANKS,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 158, 323 (1967)
- 76) Mc CHESNEY, E.W., J.M. SHEKOSKY, P.H. HERNANDEZ,
Biochem. Pharmacol. 16, 2444 (1967)
- 77) Mc MARTIN, C., H.V. STREET,
J. Chromatogr. 22, 274 (1966)
- 78) Mc NAIR, H.M., E.J. BONELLI,
Basic Gas Chromatography, Varian Aerograph,
Walnut Creek 1965
zitiert nach R. KAISER ⁸²⁾ S.124

- 79) MONNET, R., H. BOITEAU, C. MOUSSION,
Ann. Biol. Clin. (Paris) 22, 429 (1964)
- 80) MÜNCH, U.,
Dissertation, Erlangen 1972
- 81) MÜTING, D.,
Nature (London) 195, 1003 (1962)
- 82) N.N.
Gas-Chrom Newsletter 11 (3), 1 (1970)
- 83) NICKEL, P.,
Habilitationsschrift, Erlangen 1969
- 84) NICKEL, P., L. SCHRIMPL, E. FINK, O. DANN,
Liebigs Ann. Chem. 744, 119 (1971)
- 85) NICKEL, P.,
unveröffentlichte Versuche
- 86) PAGE, F.M., WOOLLEY, D.E.,
Analytic. Chem. 40, 210 (1968)
- 87) PETERS, W.,
Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria,
Academic Press, London and New York 1970
- 88) The Pharmacopeia of the United States of America,
Eighteenth Revision, S. 794, 1970
- 89) PORTER, T.H., F.S. SKELTON, K. FOLKERS,
J. Med. Chem. 14, 1029 (1971)
15, 34 (1972)
- 90) PREISINGER, L.,
Dissertation, Erlangen 1970
- 91) PROUTY, R.W., K. KURODA,
J. Lab. clin. Med. 52, 477 (1958)

- 92) Die Anregung zur praktischen Ausführung verdanke ich den zahlreichen Diskussionen mit Herrn REBER, München.
- 93) RENNER, E.,
Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen Anwendung
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1970
- 94) Für diese Privatmitteilung danke ich Herrn Dr. RIEDMANN,
Böblingen
- 95) ROBINSON, A.E., A.I. COFFER, F.E. CAMPS,
J. Pharmacy Pharmacol. 22, 700 (1970)
- 96) ROLLO, J.M.,
Drugs used in the Chemotherapy of Malaria,
in L.S. Goodman and A. Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4. Aufl.,
The MacMillan Company, New York 1970
- 97) SCHERMER, S.,
Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere,
2. Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig 1958
- 98) SCHNEIDER, J., A. NENNA, J. COUTURE,
Bull. World Health Organ. 29, 417 (1963)
- 99) SCHÖNHÖFER, F.,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 274, 1 (1942)
- 100) SCHÖNHÖFER, F., W. SCHULEMANN,
Dtsch. Bundes-Pat. 1.186.861 vom 7.10.1965,
Franz. Pat. M 2433,
ref. C.A. 61, 13290h (1964)
- 101) SCHRIMPL, L.,
Dissertation, Erlangen 1968

- 102) SEIDEL, H.-R.,
Unveröffentlichte Versuche
- 103) SMITH, E.D.,
Analytic. Chem. 32, 1049 (1960)
- 104) SMITH, E.D., R.D. RADFORD,
Analytic. Chem. 33, 1160 (1961)
- 105) SMITH, C.C.,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 116, 67 (1956)
- 106) STAHL, E.,
Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshand-
buch, 2. Aufl.,
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
- 107) STEPAN, J., B. KAKAC,
Med. Exp. 11, 352 (1964)
ref. C.A. 62, 7005 g (1965)
- 108) STRUFE, R.,
Clin. Chim. Acta 5, 753 (1960)
ref. C.A. 55, 1765 f (1961)
- 109) SVOJANOVSKY, V., M. DRESSLER, J. JANAK,
in H.G. STRUPPE: Gas-Chromatographie, S. 545,
Akademie-Verlag, Berlin 1968
- 110) TARLOV, A.R., G.J. BREWER, P.E. CARSON,
A.M.A. Arch. intern. Med. 109, 209 (1962)
- 111) TITUS, E.O., L.C. CRAIG, C. GOLUMBIC, H.R. MIGTHON,
I.M. WEMPEN, R.C. ELDERFIELD,
J. org. Chemistry 13, 39 (1948)
- 112) TRAGER, W., M.C. HUTCHINSON,
J. clin. Invest. 25, 694 (1946)

- 113) UDENFRIEND, S., D.E. DUGGAN, B.M. VASTA,
B.B. BRODIE,
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 120, 26 (1957)
- 114) UDENFRIEND, S.,
Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Vol. I,
Academic Press, New York und London 1962
- 115) VANDEN HEUVEL, W.J.A., E.O.A. HAAHTI, E.C. HORNING,
Clin. Chem. 8, 351 (1962)
- 116) VEENING, H., G.D. DUPRE,
J. Gas Chromatogr. 4, 153 (1966)
- 117) WAARST, V.,
Arch. Pharmac. og Chem. 71, 116 (1964)
- 118) WALLE, T., H. EHRSSON,
Acta Pharm. Suecica 7, 389 (1970)
- 119) WALLE, T., H. EHRSSON,
Acta Pharm. Suecica 8, 27 (1971)
- 120) WILLIS, D.E.,
Chromatographia 5, 42 (1972)
- 121) WISELOGLE, F.Y.,
A Survey of Antimalarial Drugs, 1941 - 1945,
J.W. Edwards, Ann Arbor, Michigan 1946
- 122) WOLFF, A.,
Unveröffentlichte Versuche
- 123) ZIMMERMANN, R.,
Dissertation, Erlangen 1971
- 124) ZUBROD, C.G., T.J. KENNEDY, J.A. SHANNON,
J. clin. Invest. 27, Suppl., 114 (1948)

LEBENS LAUF

13. 11. 1939 Geboren in Alling bei Regensburg als erstes von vier Kindern.
Vater: Hans Paulus, Kaufmann, gestorben 1958.
Mutter: Margarete Paulus, geb. Schuderer.
- 1945 - 1950 Besuch der Volksschule in Viehhausen.
- 1950 - 1951 Besuch der Oberrealschule in Schwandorf und der
- 1951 - 1960 Oberrealschule in Regensburg.
13. 7. 1960 Abitur an der Oberrealschule in Regensburg.
- Aug. 1960 - Apothekerpraktikant in der Königs-Apotheke in
Sept. 1962 Regensburg.
5. 9. 1962 Pharmazeutische Vorprüfung in Regensburg.
- Nov. 1962 - Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-
Aug. 1965 Nürnberg.
12. 8. 1965 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen.
- Nov. 1965 - Studium der Lebensmittelchemie in Erlangen.
Okt. 1967
14. 10. 1966 Bestallung als Apotheker.
2. 10. 1967 Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker.
- Okt. 1967 - Wehrdienst am Institut für Wehrpharmazie und
Juli 1969 Lebensmittelchemie in München.
- ab 16. 7. 1969 Stabsapotheker der Bundeswehr.
- ab 21. 7. 1969 Doktorand bei Professor Dr. O. D a n n
am Institut für Angewandte Chemie der
Universität Erlangen-Nürnberg.
18. 10. 1966 Eheschließung mit Hildegard Poschenrieder aus Regensburg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990